PCT WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro
INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) **Internationale Patentklassifikation** 6 :
C07J 41/00, A61K 31/575, 9/127, C12N 15/63, C07C 271/20, 279/14, 237/08, A61K 31/325, 31/16, 31/155

A2

(11) **Internationale Veröffentlichungsnummer:** **WO 98/05678**

(43) **Internationales Veröffentlichungsdatum:** 12. Februar 1998 (12.02.98)

(21) **Internationales Aktenzeichen:** PCT/DE97/01669

(22) **Internationales Anmeldedatum:** 1. August 1997 (01.08.97)

(30) **Prioritätsdaten:**
196 31 189.6 2. August 1996 (02.08.96) DE

(71) **Anmelder** *(für alle Bestimmungsstaaten ausser US)*: MAX-DELBRÜCK-CENTRUM FÜR MOLEKULARE MEDIZIN [DE/DE]; Robert-Rössle-Strasse 10, D-13125 Berlin (DE).

(71)(72) **Anmelder und Erfinder:** SCHNEIDER, Manfred [DE/DE]; Triebelsheider Weg 47, D-42111 Wuppertal (DE).

(72) **Erfinder; und**
(75) **Erfinder/Anmelder** *(nur für US)*: KEIL, Oliver [DE/DE]; Krotscheiderweg 52, D-42327 Wuppertal (DE). RESZKA, Regina [DE/DE]; Goethestrasse 23, D-16341 Schwanebeck (DE). GROTH, Detlef [DE/DE]; Neue Scheune 5, D-14548 Ferch (DE).

(74) **Anwalt:** BAUMBACH, Fritz; BioTez Berlin-Buch GmbH, Patentstelle, Robert-Rössle-Strasse 10, D-13125 Berlin (DE).

(81) **Bestimmungsstaaten:** JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).

Veröffentlicht
Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.

(54) **Title:** NOVEL CATIONIC AMPHIPHILIC LIPIDS FOR LIPOSOMAL GENE TRANSFER

(54) **Bezeichnung:** NEUARTIGE KATIONISCHE AMPHIPHILE FÜR DEN LIPOSOMALEN GENTRANSFER

(57) **Abstract**

The synthesis of novel cationic, amphiphilic lipids is disclosed, as well as their use as gene transfer vesicles *in vitro* and *in vivo*. A series of different lipids (diglycerides, steroids) was synthesised by modification with variable cationic molecules (amino acids, biogenic amines). Because of their ability to form complexes with polynucleotides (DNA, RNA, antisense oligonucleotides, ribozymes, etc.), compounds of this type are useful as vectors for gene transfer (transfection).

(57) **Zusammenfassung**

Die vorliegende Erfindung betrifft die Synthese neuartiger kationischer, amphiphiler Lipide und deren Anwendung als Gentransfervesikel *in vitro* und *in vivo*. Dazu wurden eine Reihe unterschiedlicher Lipide (Diglyceride, Steroide) durch Modifizierung mit variablen kationischen Molekülen (Aminosäuren, biogene Amine) synthetisiert. Verbindungen dieser Art eignen sich, aufgrund ihrer Fähigkeit mit Polynukleotiden (DNS, RNS, Antisense Oligonukleotide, Ribozyme usw.) zu komplexieren, als Vektoren für den Gentransfer (Transfektion).

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

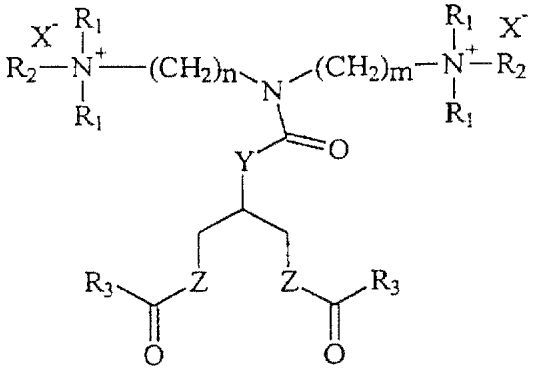
Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	**ES**	Spanien	**LS**	Lesotho	**SI**	Slowenien
AM	Armenien	**FI**	Finnland	**LT**	Litauen	**SK**	Slowakei
AT	Österreich	**FR**	Frankreich	**LU**	Luxemburg	**SN**	Senegal
AU	Australien	**GA**	Gabun	**LV**	Lettland	**SZ**	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	**GB**	Vereinigtes Königreich	**MC**	Monaco	**TD**	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	**GE**	Georgien	**MD**	Republik Moldau	**TG**	Togo
BB	Barbados	**GH**	Ghana	**MG**	Madagaskar	**TJ**	Tadschikistan
BE	Belgien	**GN**	Guinea	**MK**	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	**TM**	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	**GR**	Griechenland			**TR**	Türkei
BG	Bulgarien	**HU**	Ungarn	**ML**	Mali	**TT**	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	**IE**	Irland	**MN**	Mongolei	**UA**	Ukraine
BR	Brasilien	**IL**	Israel	**MR**	Mauretanien	**UG**	Uganda
BY	Belarus	**IS**	Island	**MW**	Malawi	**US**	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	**IT**	Italien	**MX**	Mexiko		
CF	Zentralafrikanische Republik	**JP**	Japan	**NE**	Niger	**UZ**	Usbekistan
CG	Kongo	**KE**	Kenia	**NL**	Niederlande	**VN**	Vietnam
CH	Schweiz	**KG**	Kirgisistan	**NO**	Norwegen	**YU**	Jugoslawien
CI	Côte d'Ivoire	**KP**	Demokratische Volksrepublik Korea	**NZ**	Neuseeland	**ZW**	Zimbabwe
CM	Kamerun			**PL**	Polen		
CN	China	**KR**	Republik Korea	**PT**	Portugal		
CU	Kuba	**KZ**	Kasachstan	**RO**	Rumänien		
CZ	Tschechische Republik	**LC**	St. Lucia	**RU**	Russische Föderation		
DE	Deutschland	**LI**	Liechtenstein	**SD**	Sudan		
DK	Dänemark	**LK**	Sri Lanka	**SE**	Schweden		
EE	Estland	**LR**	Liberia	**SG**	Singapur		

Neuartige kationische Amphiphile für den liposomalen Gentransfer

Beschreibung

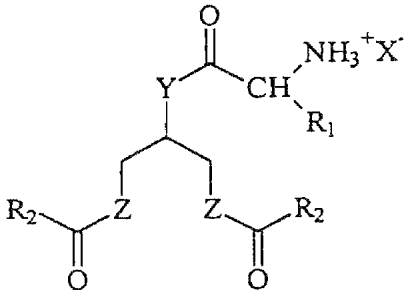
Die Erfindung betrifft kationische Lipide der allgemeinen Formel I,



I

wobei n=2,3,4,6,8 und m=2,3,6,8 sein kann und R_1 = H, CH_3, CH_2CH_2OH; R_2 = H, CH_3, CH_2CH_2OH, $(CH_2)_3N^+(R_1)_3$, R_3 einen geradkettigen, gesättigten oder ungesättigten aliphatischen Rest C_7-C_{21}, Z = CH_2, O, NH, Y = CH_2, O, NH und X = Cl, Br, I, CH_3COO, CF_3COO bedeutet;

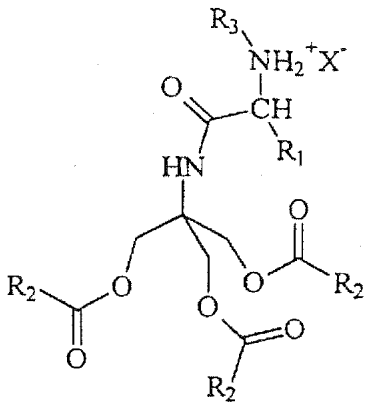
kationische Lipide der Formel II,



II

wobei R_1 einen aliphatischen, aromatischen oder heteroaliphatischen α-C-Atom-Substituenten der α-Aminosäuren Glycin, Alanin, Valin, Leucin, Isoleucin, Phenylalanin, Tyrosin, Prolin, Hydroxyprolin, Serin, Threonin, Cystein, Cystin, Methionin, Tryptophan, Arginin, Lysin, Ornithin, Histidin, R_2 einen geradkettigen, gesättigten oder ungesättigten aliphatischen Rest C_7-C_{21}, X = Cl, Br, I, CH_3COO, CF_3COO, Y = CH_2, O, NH und Z = CH_2, O, NH bedeutet;

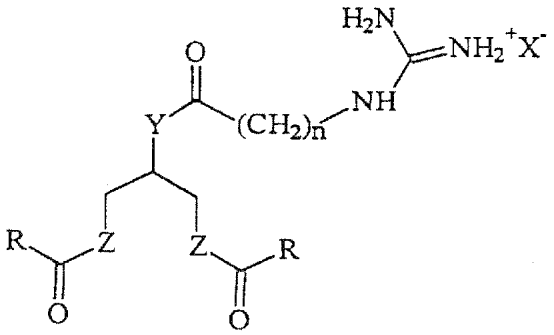
kationische Lipide der allgemeinen Formel III,



III

wobei R_1 = H, CH_3, $(CH_2)_3NH_2^+X^-(CH_2)_3NH_3^+X^-$, R_3 = H, $(CH_2)_3NH_3^+X^-$, R_2 einen geradkettigen, gesättigten oder ungesättigten aliphatischen Rest C_7-C_{21} und X = Cl, Br, I, CH_3COO, CF_3COO bedeutet;

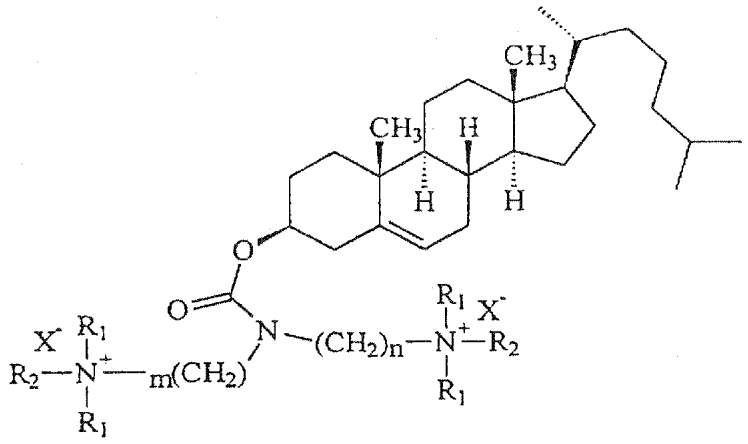
kationische Lipide der allgemeinen Formel IV,



IV

wobei n=1-4 sein kann und R einen geradkettigen, gesättigten oder ungesättigten aliphatischen Rest C_7-C_{21}, Y = CH_2, O, NH, Z = CH_2, O, NH und X = Cl, Br, I, CH_3COO, CF_3COO bedeutet;

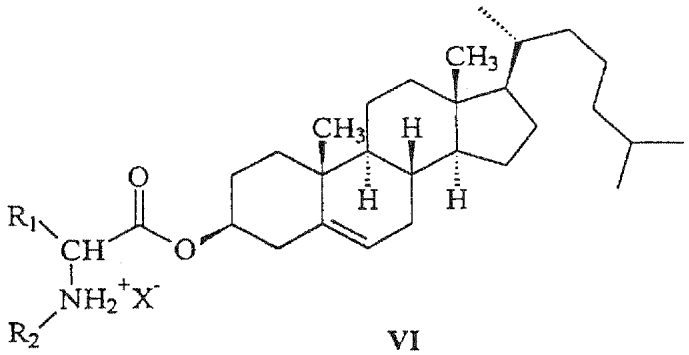
kationische Lipide der allgemeinen Formel V,



V

wobei n=2,3,4,6,8 und m=2,3,6,8 sein kann und R_1 = H, CH_3, CH_2CH_2OH; R_2 = H, CH_3, CH_2CH_2OH, $(CH_2)_3N^+(R_1)_3$ und X = Cl, Br, I, CH_3COO, CF_3COO bedeutet;

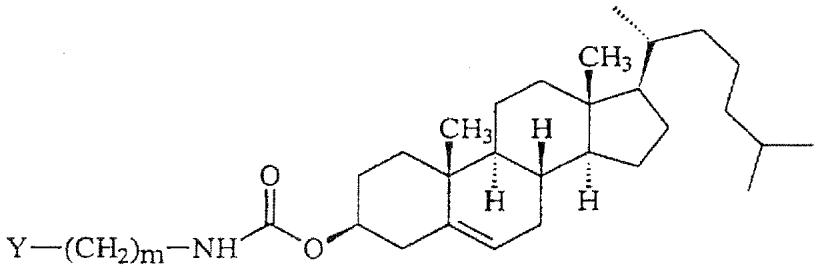
kationische Lipide der allgemeinen Formel VI,



VI

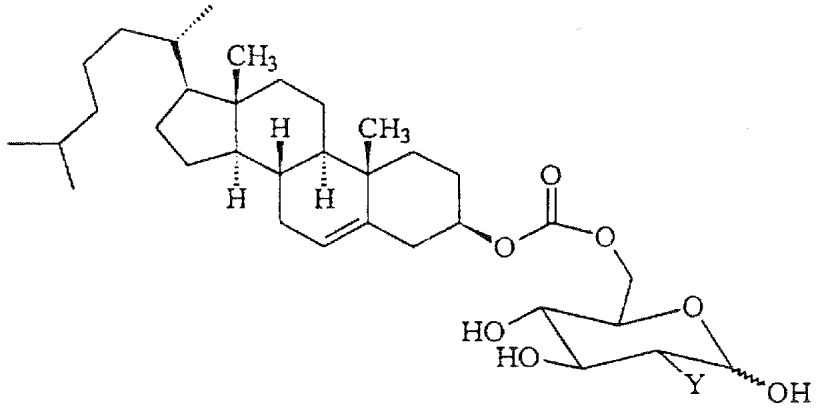
wobei R_1 = H, CH_3, $(CH_2)_3NH_2^+X^-(CH_2)_3NH_3^+X^-$, $(CH_2)_3NH_3^+X^-$. R_2 = H, $(CH_2)_3NH_3^+X^-$ und X = Cl, Br, I, CH_3COO, CF_3COO bedeutet;

kationische Lipide der allgemeinen Formel VII,



VII

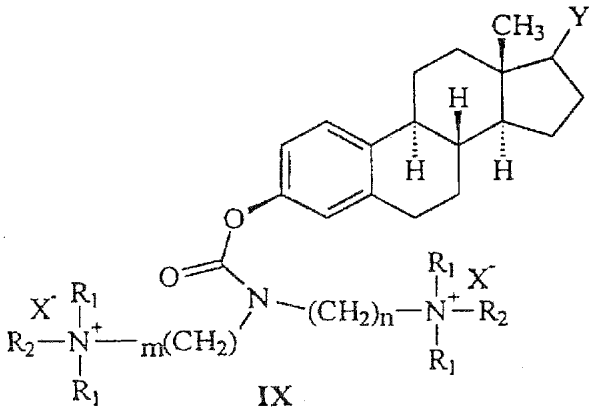
wobei m=2-6 sein kann und Y eine Gruppe $N(R)_3^+X^-$ mit R = H, CH_3, $(CH_2)_2OH$ oder eine Gruppe $NH\text{-}C(NH_2^+X^-)NH_2$ mit X = Cl, Br, I, CH_3COO, CF_3COO bedeutet;
kationische Lipide der allgemeinen Formel VIII,



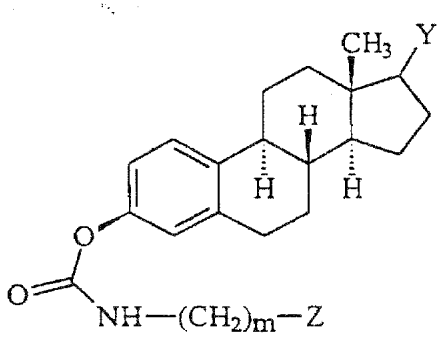
VIII

wobei Y eine Gruppe $N(R)_3^+X^-$ mit R = H, CH_3, $(CH_2)_2OH$ oder eine Gruppe $NH\text{-}C(NH_2^+X^-)NH_2$ mit X = Cl, Br, I, CH_3COO, CF_3COO bedeutet;

kationische Lipide der allgemeinen Formel IX und X,



IX



X

wobei n=2,3,4,6,8 und m=2,3,6,8 sein kann und R_1 = H, CH_3, CH_2CH_2OH; R_2 = H, CH_3, CH_2CH_2OH, $(CH_2)_3N^+(R_1)_3$, R = H, CH_3, $(CH_2)_2OH$, Y eine Gruppe Carbonyl (=O (Östron)) oder eine Gruppe OH (Östradiol), Z eine Gruppe $N(R)_3{}^+X^-$ mit R = H, CH_3, $(CH_2)_2OH$ oder eine Gruppe NH-$C(NH_2{}^+X^-)NH_2$ und X = Cl, Br, I, CH_3COO, CF_3COO bedeutet.

Kationische Lipide der allgemeinen Formel I-X sind geeignete Reagenzien für den liposomalen Gentransfer (Transfektion). Anwendungsgebiete derartiger Transfektionsreagenzien liegen in der Medizin und in der Gentechnik.
Das Einbringen genetischen Materials in eukaryontische Zellen ist ein grundlegendes Verfahren zum Studium biologischer Funktionen und von zunehmender Bedeutung für die gentherapeutische Behandlung verschiedener Erkrankungen, von denen die Tumoren an erster Stelle zu nennen sind.
Man unterscheidet hierbei biologische, physikalische und physikochemische Methoden für den Transfer von DNA, RNA und Proteinen in die Zielzelle [Wagner J, Madry, H., Reszka, R (1995). *In vivo* gene transfer: focus on the kidney. Nephrol. Dial.Transplant10:1801-1807 Zhu J, Zhang L, Hanisch U-K, Felgner PL,. Reszka R (1996). In vivo gene therapy of experimental brain tumors by continuous administration of DNA-liposome complexes. Gene Therapy 3: 472-476, Kiehntopf, M., Brach MA & Hermann F (1995). Gentherapie in der Onkologie: Perspektiven, Chancen und Risiken. Onkologie 18 (Sonderheft): 16-26].
Physikalische Methoden wie Elektroporation und Mikroinjektion sind nur für den *ex vivo* und *in vitro* Transfer geeignet. Die sogenannte "Jet"- Injektions-Methode läßt sich darüberhinaus auch für den *in vivo* Gentransfer anwenden (Leber, Haut). Physikochemische Methoden wie Kalziumphosphatpräzipitationstechnik (KPP)- und DEAE-Dextran-Transfektion, sind auf *in vitro* und *ex vivo* Anwendungen begrenzt. Der zur Zeit in einer Reihe von klinischen Studien (Phase I/II) erprobte retrovirale Gentransfer mit Hilfe virusproduzierender Zellen ist durch eine längeranhaltende, aber relativ niedrige Genexpression in sich teilende Zellen gekennzeichnet. Problematisch beim retroviralen Gentransfer ist vor allem die Entwicklung einer spezifischen Immunantwort gegen die implantierten virusproduzierenden Helferzellen, die Möglichkeit der Generierung replikationskompetenter Viren und die Gefahr einer Aktivierung von zellulären Onkogenen bzw. Inaktivierung von Suppressorgenen als Resultat der zufälligen Lokalisation der Geninsertion. Die notwendigen umfangreichen zellbiologischen und medizinischen Vorarbeiten und die aufwendigen Sicherheitsvorkehrungen lassen hohe Kosten bei der klinischen Anwendung des retroviralen Gentransfers erwarten.
Vektoren auf der Basis von Adenoviren sind ebenfalls aussichtsreiche Gentransfervehikel. Diese erreichen hohe Transfektionsraten auch in sich nicht teilendem Gewebe. Da die DNA nicht in das Genom integriert wird, ist die Dauer der Fremdgenexpression begrenzt und einer

wiederholten Anwendung *in vivo* steht die starke spezifische Immunantwort des Wirtsorganismus bei wiederholten Applikationen entgegen.

Der liposomal vermittelte Gentransfer hat dagegen in den letzten Jahren auch für *in vivo* Anwendungen an Bedeutung gewonnen. Die Genkonstrukte lassen sich entweder in die Liposomen verkapseln oder werden mit der Membran assoziiert. Liposomale Präparationen zeichnen sich durch eine einfache Handhabung, geringe Immunreaktivität und damit wiederholbare Anwendbarkeit bei niedrigem Sicherheitsrisiko für Anwender und "Empfänger" aus. Noch am Anfang steht die Anwendung von Immunoliposomen als Transportvehikel für genetisches Material.

Ein ebenfalls interessanter Ansatz ist die Verwendung fusogener Liposomen, die in ihrem Inneren einen Komplex aus DNA und Kernprotein (HMG I) tragen [Kaneda, Iwai, K., Uchida, T(1989). Increased expression of DNA cointroduced with nuclear protein in adult rat liver Science 243, 375-378,Kaneda Y, Kato, K., Nakanishi, M., Uchida, T.(1996) Introduction of plasmid DNA and nuclear protein into cells by using erythrocyte ghosts, liposomes, and Sendai virus. Methods-Enzymol. 221:317-327].

Seit einigen Jahren werden kationische Liposomen für den Transfer von DNA (Felgner PL, Gadek TR, Holm M et al. (1987). Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA transfection procedure. Proc Natl Acad Sci USA 84:7413-7417, Felgner JH, Kumar R, Sridhar CN et al. (1994). Enhanced gene delivery and mechanism studies with a novel series of cationic lipid formulations. J Biol Chem 269:2550-2561), Antisense-Oligomeren, Proteinen und Ribozymen mit Erfolg eingesetzt. DNA wird dabei über elektrostatische Wechselwirkungen mit der Membran der Liposomen assoziiert und über einen bisher noch unvollständig verstandenen Mechanismus in die Zielzelle transferiert. Die Transferrate *in vitro* ist dabei in Abhängigkeit von der Zellinie mit der Effizienz des retroviralen Gentransfer vergleichbar. Zur Zeit befinden sich die ersten kationischen Liposomen/DNA/Komplexe [DMRIE/DOPE und DOTMA/DOPE (Lipofectin, Gibco BRL USA) sowie DC-Chol/DOPE] in einer klinischen Phase I/II Prüfung (Gao, X., Huang, L. (1995) Cationic liposome-mediated gene transfer. Gene Therapy 2:710-722).

Kationische, amphiphile Moleküle, bestehend aus einem Lipidteil (Steroid-oder Diglycerid-Gerüst) und einer positiv geladenen Kopfgruppe (Ammonium-Ionen) sind in der Lage, entweder spontan oder nach Zusatz eines Hilfslipids (Dioleoylphosphatidylethanolamin (DOPE)) Liposomen auszubilden. DNA wird dabei über elektrostatische Wechselwirkungen mit der Membran der Liposomen assoziiert und über einen bisher noch unvollständig verstandenen Mechanismus in die Zielzelle transferiert.

Für einen möglichst effizienten in vitro und in vivo Gentransfer sollten die zur Generierung der Liposomen verwendeten kationischen Lipide die folgenden Kriterien erfüllen:

1. Sie sollten nicht toxisch und biologisch abbaubar sein und keine Immunreaktionen hervorrufen

2. Sie sollten möglichst effizient mit der DNA komplexieren, diese vor Abbaureaktionen schützen und hohe Transferraten aufweisen
3. Sie sollten Zellen rezeptorspezifisch transfizieren
4. Sie müssen leicht und in größeren Mengen synthetisiert werden können

Sowohl die Syntheseverfahren als auch die Moleküle selbst der bislang in der Literatur beschriebenen kationischen Amphiphile weisen eine Reihe von Nachteilen auf. Die Synthese der kommerzialisierten Transfektionsreagenzien DOTMA (Lipofektin), DOGS und DOSPA verläuft über viele Stufen mit zum Teil sehr geringen Ausbeuten und die Aufreinigung der Produkte erfordert eine aufwendige säulenchromatographische Reinigung. Bei vielen Verbindungen wie z.B. DOTMA, DMRIE und DOSPA sind die kationischen Kopfgruppen mit langkettigen Fettalkoholen über Etherbindungen verknüpft, welche eine sehr schlecht biologische Abbaubarkeit und somit eine hohe Toxizität des Moleküls zur Folge haben.

Der Erfindung liegt die Aufgabe zu Grunde, neuartige kationische Lipide zu finden, welche im Vergleich mit den bislang bekannten Verbindungen höhere Gentransferraten und geringere Toxizitäten aufweisen. Weiterhin liegt der Erfindung die Aufgabe zu Grunde, Verfahren zu finden, welche die Synthese der kationischen Lipide in wenigen Reaktionsstufen und mit hohen Ausbeuten ermöglicht.
Diese Aufgaben wurde gemäß den Ansprüchen I-IX gelöst. Mit den neuartigen kationischen Lipiden der Formeln I-XI werden Verbindungen zur Verfügung gestellt, die den Anforderungen der Aufgabenstellung entsprechen. So wird z.B. in Abbildung 2-6 an unterschiedlichen Tumorzellinien gezeigt, daß die aus den Lipiden SP-Chol, O-Chol, Put-Chol und DOSGA und dem Helferlipid Dioleoylphosphatidylethanolamin (DOPE) (in den beschriebenen molaren Verhältnissen) hergestellten Liposomen im Vergleich zu DC-Chol/DOPE Vesikel deutlich höher transfizieren in Abwesenheit von Serum. An der Ratten-Kolonkarzinomlinie CC531 (Abb.3) transfizieren SP-Chol und O-Chol/DOPE signifikant höher als DC-Chol/DOPE bei einem 5%igem Serumanteil. Besonders überraschend sind die in Abb. 5 und 6 gezeigen hohen Transferraten, die unter Verwendung von DOSGA/DOPE-Liposomen bei einem 5%igem Serumanteil an humanen und Rattenglioblastomzellen (N64, F98) gewonnen wurden. Auch sind SP-Chol/DOPE-Liposomen in serumhaltigen Medium sehr gut geeignet, humane Brusttumorzellen (MaTu) zu transfizieren (Abb. 1) Zuordnung der Lipide:

Lipide	**Verbindungsklasse**
DC-Chol	1ß[N-(N',N'-Dimethylaminoethan)-carbamoyl]cholesterol
Sp-Chol	V Beispiel 4
Put-Chol	VII Beispiel 4
O-Chol	VI Beispiel 5
DOSGA	IV Beispiel 3

Die Herstellung der erfindungsgemäßen Verbindungen erfolgt gemäß den beigefügten Schemata.

Schema I beschreibt das Verfahren zur Herstellung neuartiger kationischer Lipide mit 1,3-Diglycerid-Grundgerüst an denen die kationische Kopfgruppe über einen Carboxylat-Spacer angeknüpft ist.

Schema II beschreibt das Verfahren zur Synthese 1,3-Diglycerid-modifizierter Aminosäuren.

Schema III beschreibt das Verfahren zur Synthese 1,3-Diglycerid-modifizierter Guanidin-Derivate.

Schema IV beschreibt das Verfahren zur Synthese neuartiger Cholesterol-Derivate mit biogenen Aminen als kationischen Kopfgruppen.

Schema V beschreibt das Verfahren zur Synthese Aminosäure-modifizierter Cholesterol-Derivate.
Schema VI beschreibt das Verfahren zur Synthese Glucosamin-modifizierter Cholesterol-Derivate.

Schema VII beschreibt das Verfahren zur Synthese kationisch-modifizierter Oestradiol-Derivate.

Schema VIII beschreibt das Verfahren zur Synthese kationisch-modifizierter Oestron-Derivate.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, das es nunmehr möglich ist, durch die beschriebenen Verfahren unter kostengünstigen Bedingungen und unter Verwendung preiswerter Chemikalien Transfektionsreagenzien zu synthetisieren, welche eine unerwartet hohe Gentransferrate und eine gute biologische Abbaubarkeit aufweisen.

Die Erfindung soll nachfolgend durch Ausführungsbeispiele näher erläutert werden.

Ausführungsbeispiele

Beispiel 1

Herstellung von 2-(N^5-carbamoyl-(N^1,N^{10},N^{14}-ammoniumtetraazadecan))-1,3-dioleoyloxy-propan-tri-trifluoracetat I

247 µl (1 mmol) 1,3-Dibenzyloxy-2-propanol wurden mit 7 ml einer 20%igen Lösung von Phosgen in Toluol versetzt und 48 h bei RT gerührt. Nach dieser Zeit wurde überschüssiges Phosgen mit Argon ausgetrieben und der Ansatz zu einer Lösung von 302 mg (0.6 mmol) N^1,N^{10},N^{14}-tris-BOC-spermin und 300 µl Triethylamin in 5 ml Methylenchlorid zugetropft und für 4 h bei RT gerührt. Anschließende Säulenchromatographische Reinigung (Kieselgel 60) ergaben 375 mg (47%) 2-(N^5-carbamoyl-(N^1,N^{10},N^{14}-tris-BOC-tetraazadecan))-1,3-dibenzyloxy-propanol (zähes Öl).

670 mg (0.84 mmol) 2-(N^5-carbamoyl-(N^1,N^{10},N^{14}-tris-BOC-tetraazadecan))-1,3-dibenzyloxy-propanol wurden daraufhin in 25 ml Ethanol gelöst, mit 150 mg Pd/C (5%) versetzt und 24 h hydriert. Nach Absaugen des Katalysators erhielt man 520 mg (100%) 2-(N^5-carbamoyl-(N^1,N^{10},N^{14}-tris-BOC-tetraazadecan))-1,3-propantriol (zähes Öl).

472 mg (0.76 mmol) 2-(N^5-carbamoyl-(N^1,N^{10},N^{14}-tris-BOC-tetraazadecan))-1,3-propantriol wurden mit 452 mg (1.6 mmol) Ölsäure, 334 mg (1.62 mmol) DCC und 20 mg DMAP in 30 ml Methylenchlorid gelöst und 24 h bei RT gerührt. Anschließende Säulenchromatographische Reinigung (Kieselgel 60) ergaben 457 mg (52%) 2-(N^5-carbamoyl-(N^1,N^{10},N^{14}-tris-BOC-tetraazadecan))-1,3-dioleoyloxy-propan (zähes Öl).

200 mg (0.17 mmol) 2-(N^5-carbamoyl-(N^1,N^{10},N^{14}-tris-BOC-tetraazadecan))-1,3-dioleoyloxy-propan wurden mit 3 ml TFA/CH_2Cl_2 (1:1) versetzt und 30 min bei RT gerührt. Der Ansatz wurde mit 10 ml Dioxan verdünnt und im Hochvakuum vom Lösungsmittel befreit. Man erhielt 202 mg (99%) 2-(N^5-carbamoyl-(N^1,N^{10},N^{14}-ammoniumtetraazadecan))-1,3-dioleoyloxy-propan-tri-trifluoracetat I (zähes, farbloses Öl).

Beispiel 2

Herstellung von 2-L-Alanyl-(1,3-dioleoyloxy)propylamid-trifluoracetat II

4 mmol (756 mg) Boc-L-alanin (M=189.21) und 4.3 mmol (436 mg = 600 µl) Triethylamin (M=101.19, d=0.726), wurden in 10 ml abs. Tetrahydrofuran gelöst und mit Aceton/N_2 (fl.) auf -10°C abgekühlt. Nun wurden 4 mmol (320 µl) Chlorameisensäuremethylester (M=94.50, d=1.228) zugegeben und 30 min bei 0°C gerührt. Nach Zugabe von 5 mmol (456 mg) 2-Amino-1,3-propandiol (M=91.11) wurde noch 1 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach

Entfernen des Tetrahydrofurans am Rotationsverdampfer wurden 50 ml Ethylacetat zugegeben. Die organische Phase wurde mit 5 ml ges. $NaHCO_3$-Lösung und 10 ml ges. NaCl-Lösung gewaschen und über Na_2SO_4 getrocknet. Nach Einrotieren im Wasserstrahlvakuum wurden letzte Lösungsmittelreste im Ölpumpenvakuum entfernt. Man erhielt 332 mg (32%) 2-BOC-L-Alanyl-(1,3-dihydroxy)propylamid (farbloses Öl).
2.28 mmol (598 mg) 2-BOC-L-Alanyl-(1,3-dihydroxy)propylamid, 5.70 mmol (1.610 g) Ölsäure (M=282.47), 5.70 mmol (1.176 g) Dicyclohexylcarbodiimid (M=206.33) und 0.23 mmol (28 mg) Dimethylaminopyridin (M=122.17) gelöst in 40 ml abs. CH_2Cl_2 wurden 12 h bei RT gerührt. Anschließende Reinigung des Rohprodukts durch Säulenchromatographie (Kieselgel 60) ergab 1.450 g (80%) 2-BOC-L-Alanyl-(1,3-dioleoyloxy)propylamid.
0.89 mmol (702 mg) 2-BOC-L-Alanyl-(1,3-dioleoyloxy)propylamid wurden mit 6 ml TFA/CH_2Cl_2 (1:1) versetzt und 30 min bei RT gerührt. Der Ansatz wurde mit 10 ml Dioxan verdünnt und im Hochvakuum vom Lösungsmittel befreit. Man erhielt 712 mg (99%) 2-L-Alanyl-(1,3-dioleoyloxy)propylamid-trifluoracetat II.

Beispiel 3

Herstellung von 2-(Guanidino-β-alanyl)-1,3-dioleoyloxypropylamid-hydrochlorid III

1.892 g (10 mmol) N-BOC-β-alanin wurden analog zu Beispiel 2 zu 2-BOC-β-Alanyl-1,3-dioleoyloxypropylamid (15% über beide Stufen) umgesetzt. 500 mg (0.64 mmol) 2-BOC-β-Alanyl-1,3-dioleoyloxypropylamid wurden mit 3 ml TFA/CH_2Cl_2 (1:1) versetzt und 30 min bei RT gerührt. Der Ansatz wurde dann mit 50 ml Methylenchlorid verdünnt und mit zwei mal 5 ml ges. $NaHCO_3$-Lösung extrahiert. Die über Natriumsulfat getrocknete organische Phase wurde am Rotationsverdampfer vom Lösungsmittel befreit und der Rückstand mit 103 mg (0.7 mmol) 1-H-Pyrazol-1-carboxamidin-hydrochlorid und mit 120 µl (0.7 mmol) DIEA in 20 ml DMF gelöst und über Nacht bei RT gerührt. Anschließende Reinigung des Rohprodukts durch Säulenchromatographie (Kieselgel 60) ergab 480 mg (98%) 2-(Guanidino-β-alanyl)-1,3-dioleoyloxypropylamid-hydrochlorid III (zähes Öl).

Beispiel 4

Herstellung von 3β-(N^5-carbamoyl-(N^1,N^{10},N^{14}-ammoniumtetraazadecan))-cholesterol-trihydrochlorid V

610 mg (1.2 mmol) N^1,N^{10},N^{14}-tris-BOC-spermin wurden in 10 ml Methylenchlorid gelöst und mit 674 mg (1.5 mmol) Cholesterolchlorformiat und mit 210 µl (1.5 mmol) NEt_3 versetzt. Der Ansatz wurde für 4 h bei RT gerührt und anschließend säulenchromatographisch gereinigt. Man erhielt 570 mg (52%) 3β-(N^5-carbamoyl-(N^1,N^{10},N^{14}-tris-BOC-tetraazadecan))-cholesterol (farbloser Schaum). 275 mg (0.3 mmol) 3β-(N^5-carbamoyl-

(N^1,N^{10},N^{14}-tris-BOC-tetraazadecan))-cholesterol wurden mit 6 ml MeOH (10 mmol HCl enthaltend) versetzt, 30 min bei RT gerührt und im Hochvakuum vom Lösungsmittel befreit. Man erhielt 205 mg (94%) 3β-(N^5-carbamoyl-(N^1,N^{10},N^{14}-ammoniumtetraazadecan))-cholesterol-tri-hydrochlorid V (farbloser Feststoff). Auf analoge Weise wurde ausgehend von BOC-Putrescin 3β-(*N*-Ammonium-*N'*-carbamoyl-1,4-diaminobutan)-cholesterol-hydrochlorid VII (farbloser Feststoff) synthetisiert.

Beispiel 5

Herstellung von 3β-Ornithyl-cholesterol-dihydrochlorid VI

997 mg (3 mmol) Di-BOC-Ornithin wurden in 40 ml Methylenchlorid gelöst, mit 1.16 g (3 mmol) Cholesterol, 640 mg (3.1 mmol) DCC, 50 mg DMAP versetzt, und 24 h bei RT gerührt. Es wurde vom ausgefallenen Dicyclohexylharnstoff abfiltriert im Vakuum eingeengt und der Rückstand aus 5 ml Hexan umkristallisiert. Man erhielt 1.62 g (77%) 3β-di-BOC-Ornithyl-cholesterol (farbloser Feststoff). 190 mg (0.27 mmol) 3β-di-BOC-Ornithyl-cholesterol wurden mit 6 ml MeOH (enthielt 10 mmol HCl) versetzt und 60 min bei RT gerührt. Nach Entfernen des Lösungsmittels im Hochvakuum erhielt man 146 mg (94%) 3β-Ornithyl-cholesterol-dihydrochlorid VI (farbloser Feststoff).

Beispiel 6

Herstellung von 6-(3β-Carboxycholesteroyl)-glucosamin-hydrochlorid VIII

279 mg (1 mmol) N-BOC-Glucosamin wurden in 8 ml Pyridin gelöst, mit 449 mg (1 mmol) Cholesterylchlorformiat versetzt und für 24 h bei RT gerührt. Daraufhin wurde im Hochvakuum Pyridin entfernt, in 50 ml Ether aufgenommen und mit 0.01 n HCl extrahiert. Die organische Phase wurde vom Lösungsmittel befreit und der Rückstand säulenchromatographisch (Kieselgel 60) gereinigt. Man erhielt 210 mg (30%) 6-(3β-Carboxycholesteroyl)-N-BOC-glucosamin (farbloser Feststoff). 100 mg (0.15 mmol) 6-(3β-Carboxycholesteroyl)-N-BOC-glucosamin wurden mit 3 ml ml MeOH (enthielt 5 mmol HCl) versetzt und 60 min bei RT gerührt. Nach Entfernen des Lösungsmittels im Hochvakuum erhielt man 95 mg (99%) 6-(3β-Carboxycholesteroyl)-glucosamin-hydrochlorid VIII (farbloses, zähes Öl).

Beispiel 7

Herstellung von 3-(N^5-carbamoyl-(N^1,N^{10},N^{14}-ammoniumtetraazadecan))-oestradiol-tri-hydrochlorid IX

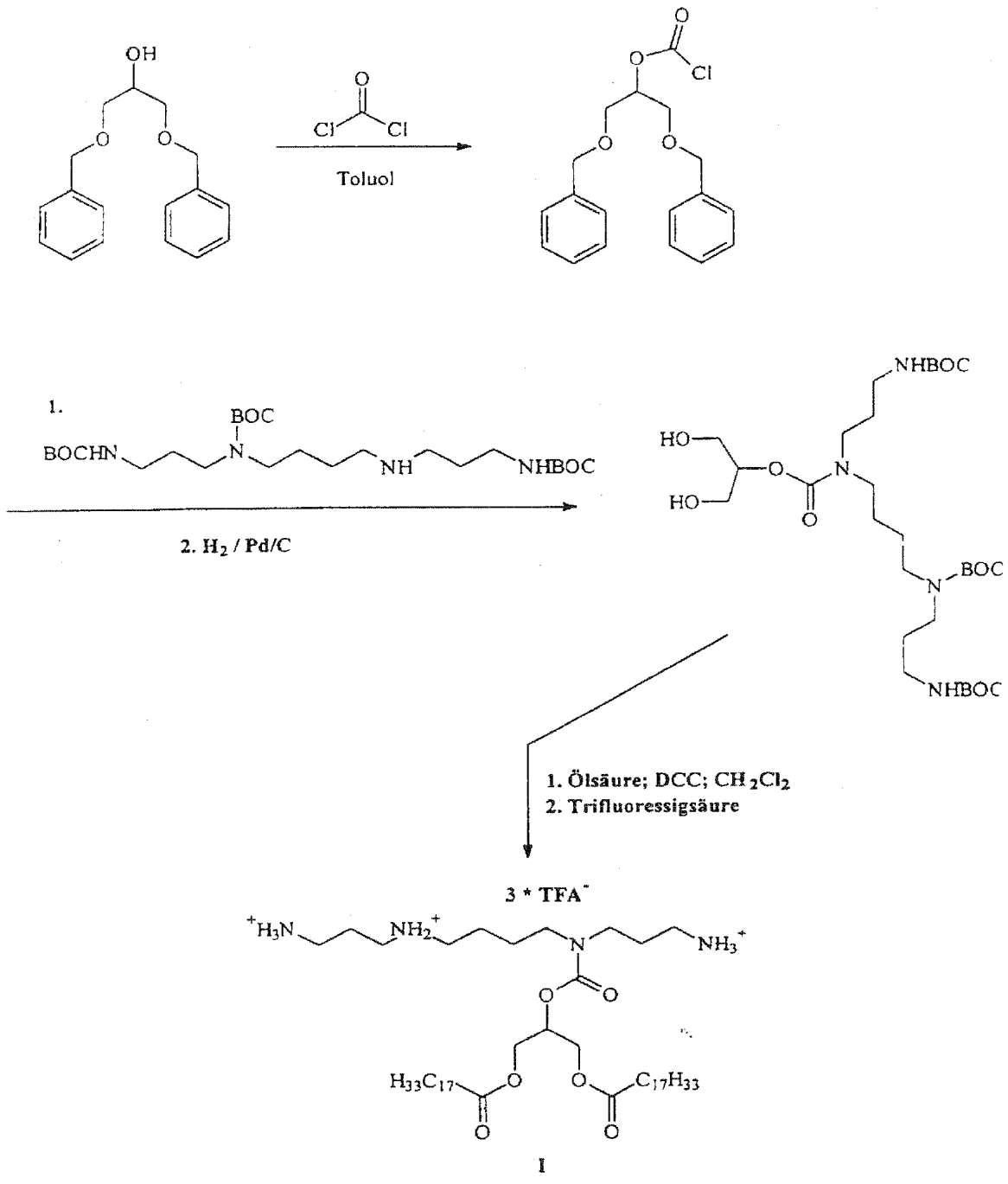
216 mg (0.8 mmol) Östron wurden in 10 ml Dioxan gelöst, mit 241 µl (2 mmol) Diphosgen und 152 µl (1.2 mmol) Dimethylanilin versetzt und 12 h bei RT gerührt. Daraufhin wurde im Hochvakuum eingeengt und der Rückstand in 15 ml Methylenchlorid gelöst. Die so erhaltene Lösung wurde zu einer Lösung von 300 mg (0.6 mmol) N^1,N^{10},N^{14}-tris-BOC-spermin und 277 µl (2 mmol) Triethylamin in 5 ml Methylenchlorid zugetropft und 4 h bei RT gerührt. Anschließende säulenchromatographische Reinigung ergab 290 mg (61%) 3-(N^5-carbamoyl-(N^1,N^{10},N^{14}-tris-BOC-tetraazadecan))-oestron (zähes Öl).
220 mg (0.28 mmol) 3-(N^5-carbamoyl-(N^1,N^{10},N^{14}-tris-BOC-tetraazadecan))-oestron wurden daraufhin in 5 ml Dioxan gelöst und mit 37 mg (0.96 mmol) Natriumborhydrid versetzt. Nach 2 stündigem Rühren bei RT wurde der Ansatz mit 0.1 N HCl auf pH 6 gebracht und drei mal mit je 50 ml Methylenchlorid extrahiert. Die organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet und am Rotationsverdampfer vom Lösungsmittel befreit. Man erhielt 219 mg (96%) 3-(N^5-carbamoyl-(N^1,N^{10},N^{14}-tris-BOC-tetraazadecan))-oestradiol (farbloser Schaum). Die Verbindung wird analog dem Beispiel 4 mit MeOH/ HCl zu 3-(N^5-carbamoyl-(N^1,N^{10},N^{14}-ammoniumtetraazadecan))-oestradiol-tri-hydrochlorid IX umgesetzt.

Beispiel 8

Herstellung von 3-(*N*,*N*-dimethylammoniumethylendiamin-*N'*-carbamoyl)-oestron-hydrochlorid X

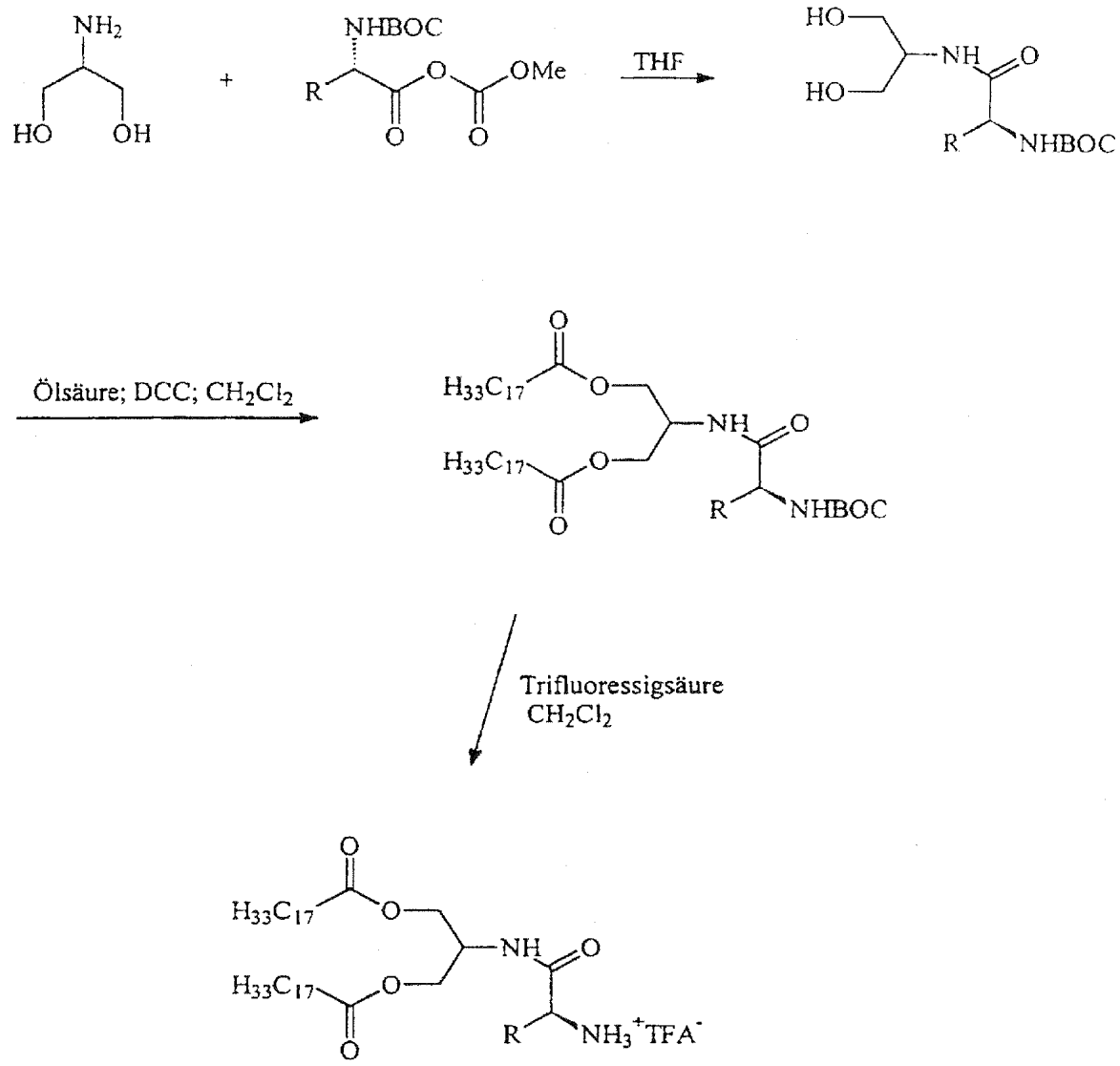
541 mg (2 mmol) Östron wurden in 20 ml Dioxan gelöst, mit 603 µl (5 mmol) Diphosgen und 380 µl (3 mmol) Dimethylanilin versetzt und 12 h bei RT gerührt. Daraufhin wurde im Hochvakuum eingeengt und der Rückstand in 15 ml Methylenchlorid gelöst. Diese Lösung wurde mit 800 µl (7.3 mmol) N,N-Dimethylaminoethylendiamin versetzt, 4 h bei RT gerührt und dann mit 100 ml Methylenchlorid verdünnt. Es wurde fünf mal mit je 20 ml 0.01 N HCl extrahiert, die organische Phase über Natriumsulfat getrocknet und vom Lösungsmittel befreit. Anschließende säulenchromatographische Reinigung (Kieselgel 60) ergab 573 mg (68%) 3-(*N*,*N*-dimethylammoniumethylendiamin-*N'*-carbamoyl)-oestron-hydrochlorid X (farbloser Feststoff).

Schema I


OH
O
O
Cl
Cl
Toluol
O
Cl
1.
BOC
BOCHN
N
NH
NHBOC
2. H_2 / Pd/C
NHBOC
HO
HO
O
N
O
BOC
N
NHBOC
1. Ölsäure; DCC; CH_2Cl_2
2. Trifluoressigsäure
3 * TFA^-
^+H_3N
NH_2^+
N
NH_3^+
O
O
$H_{33}C_{17}$
O
O
$C_{17}H_{33}$
O
O

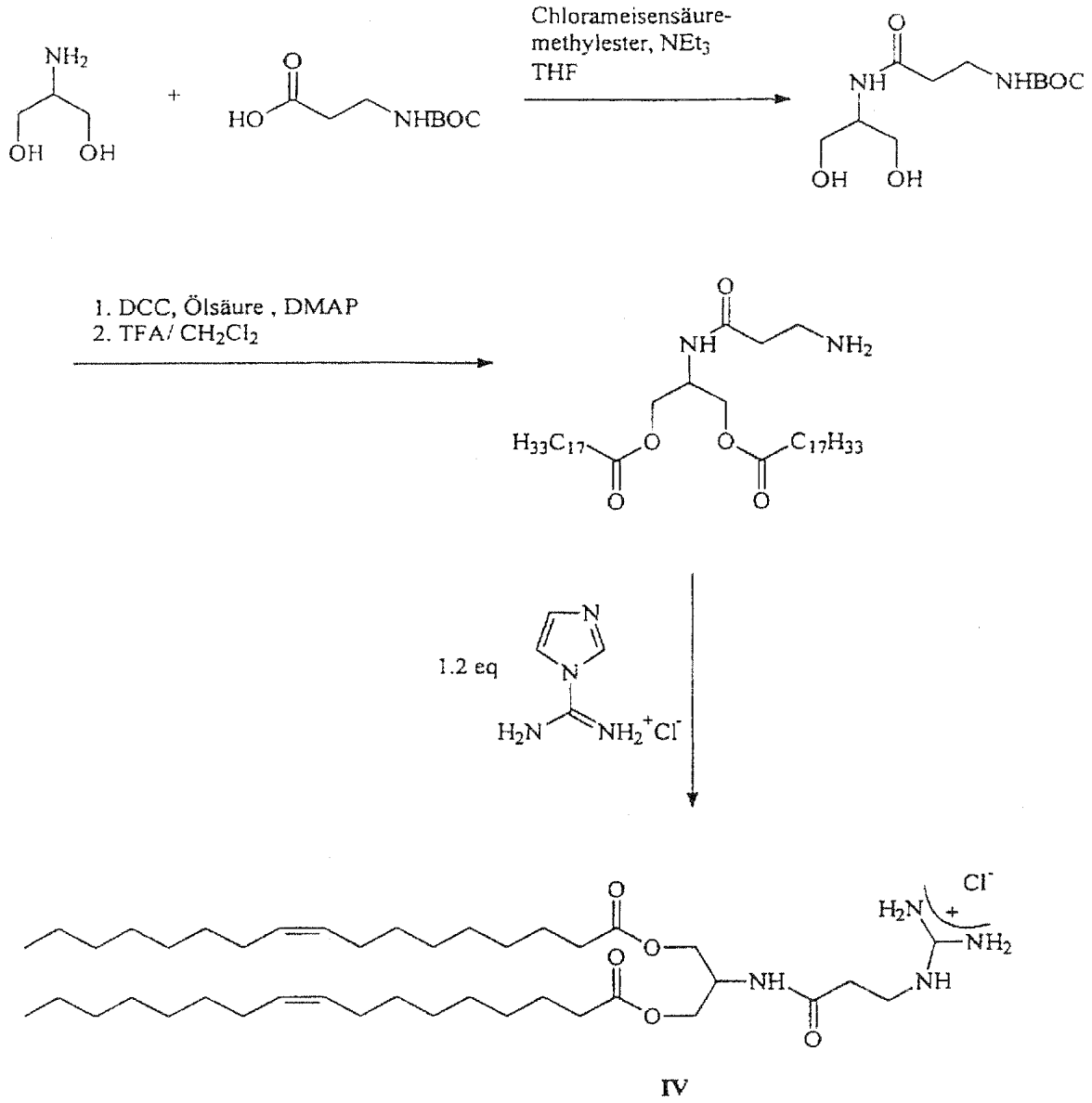
I

Schema II


NH2
HO
OH
+
NHBOC
R
O
OMe
O
O
THF
HO
HO
NH
O
R
NHBOC
Ölsäure; DCC; CH2Cl2
H33C17
O
O
H33C17
O
O
NH
O
R
NHBOC
Trifluoressigsäure
CH2Cl2
H33C17
O
O
H33C17
O
O
NH
O
R
NH3+TFA-

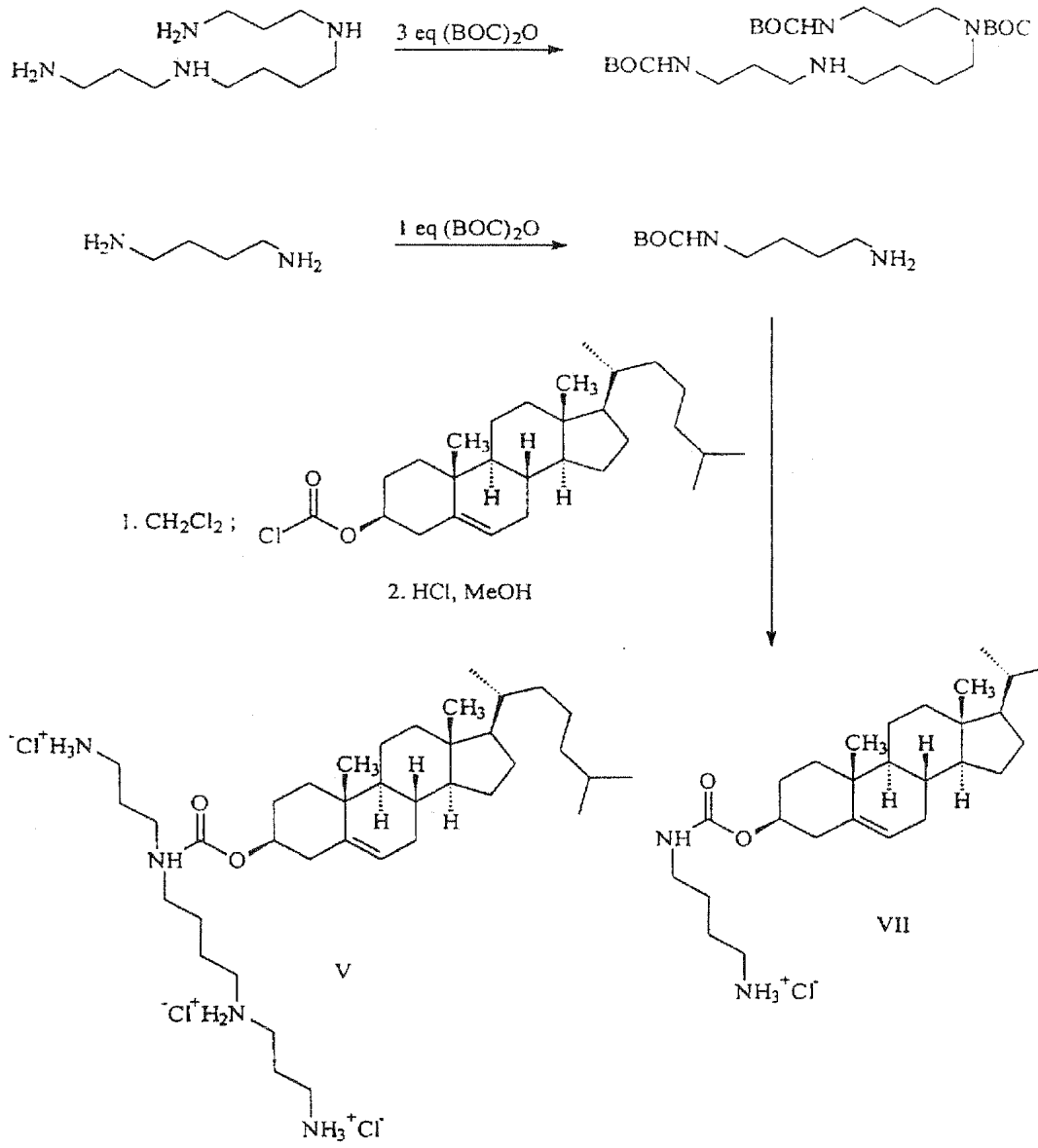
II

Schema III

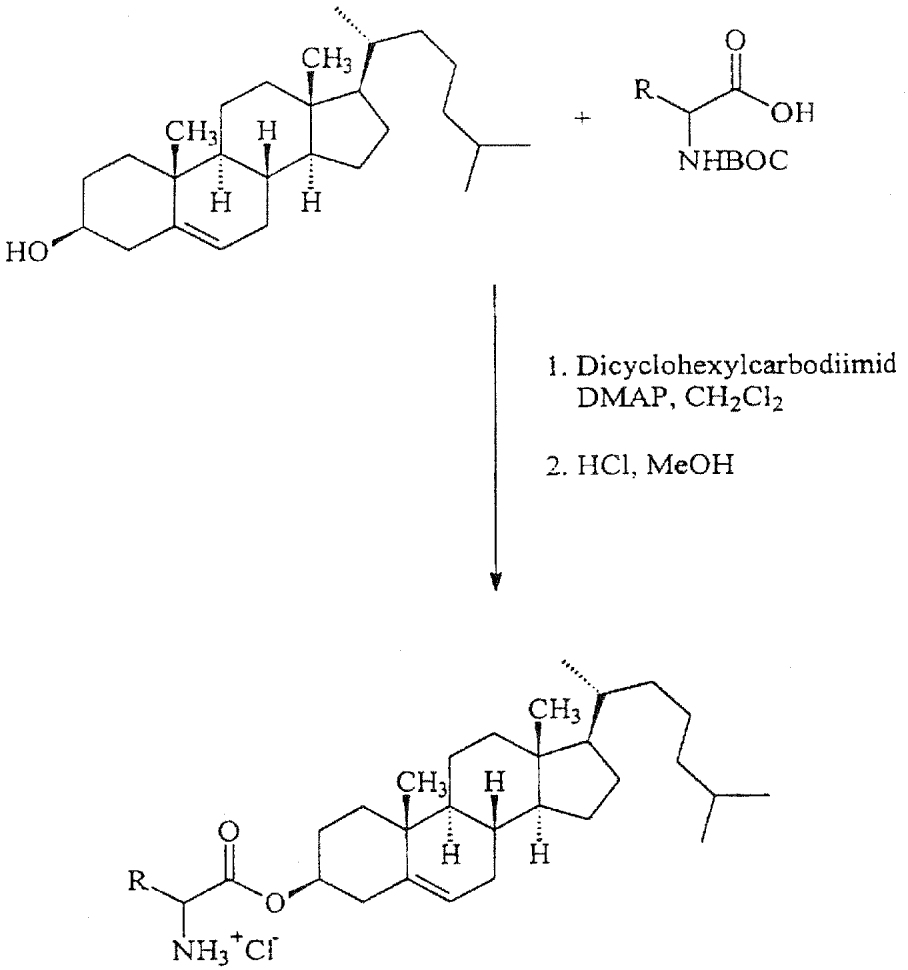


IV

Schema IV

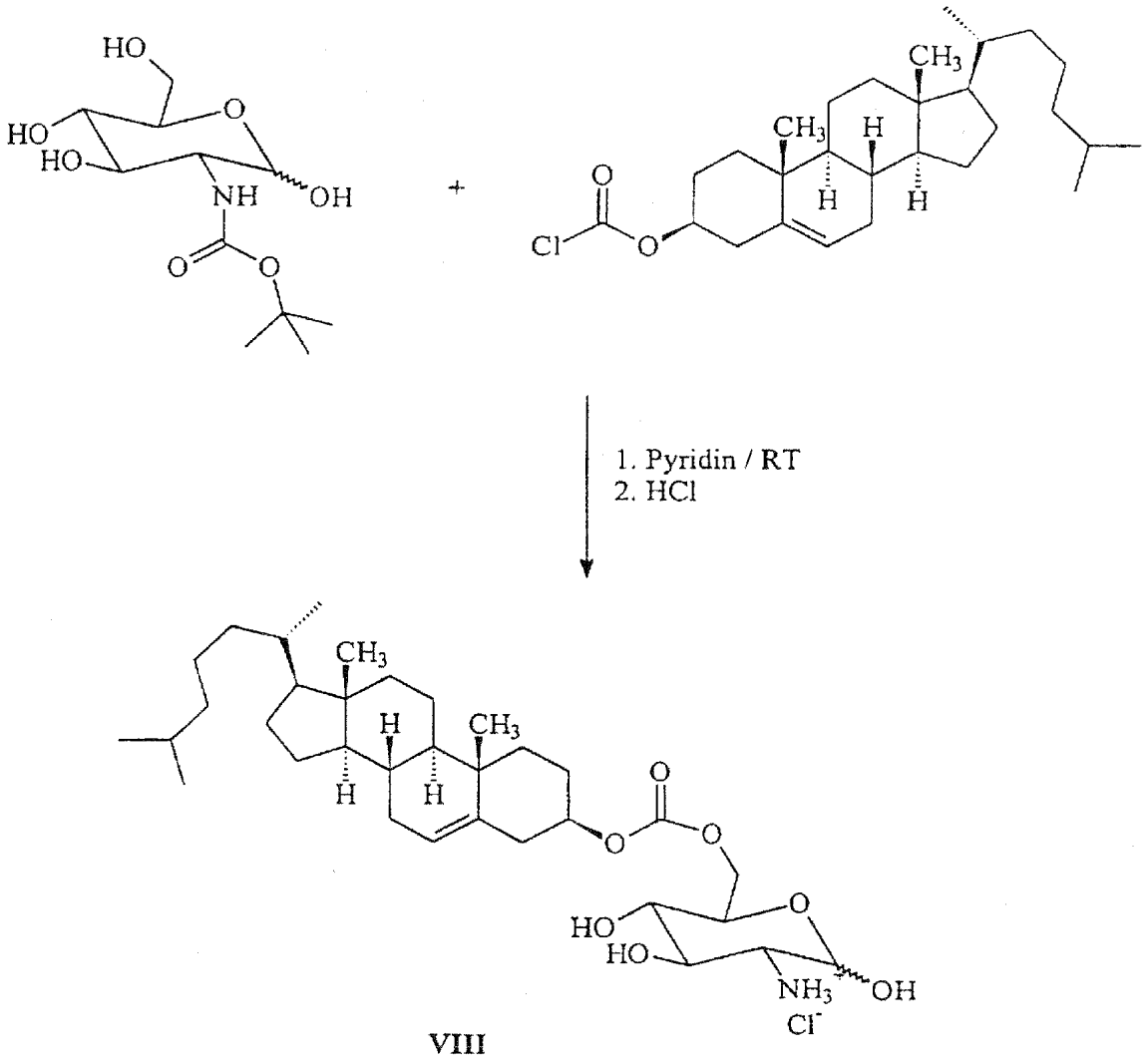


Schema V


CH3
CH3
H
H
H
HO
+
R
O
OH
NHBOC
1. Dicyclohexylcarbodiimid
DMAP, CH2Cl2
2. HCl, MeOH
CH3
CH3
H
H
H
R
O
O
NH3+Cl-

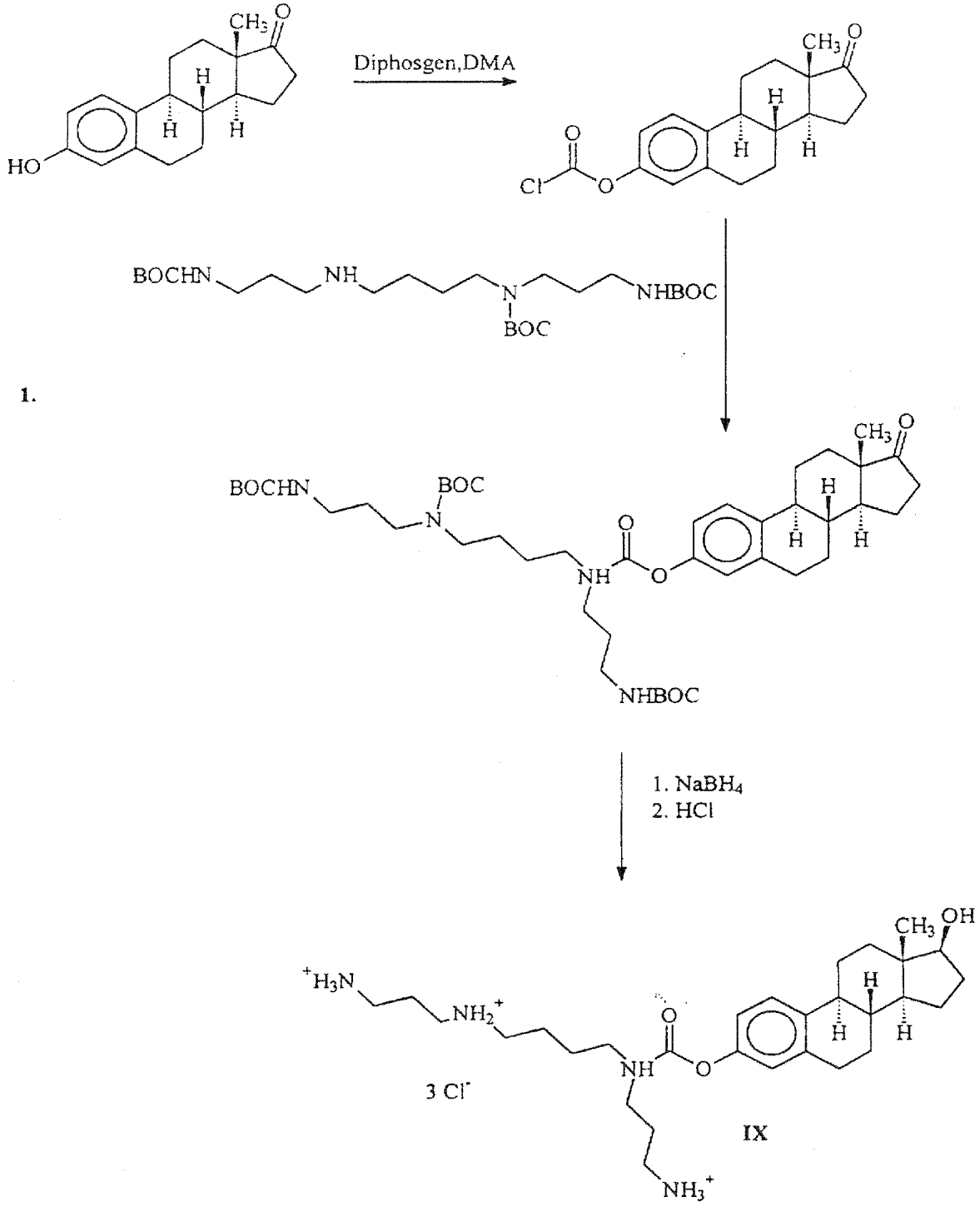
VI

Schema VI

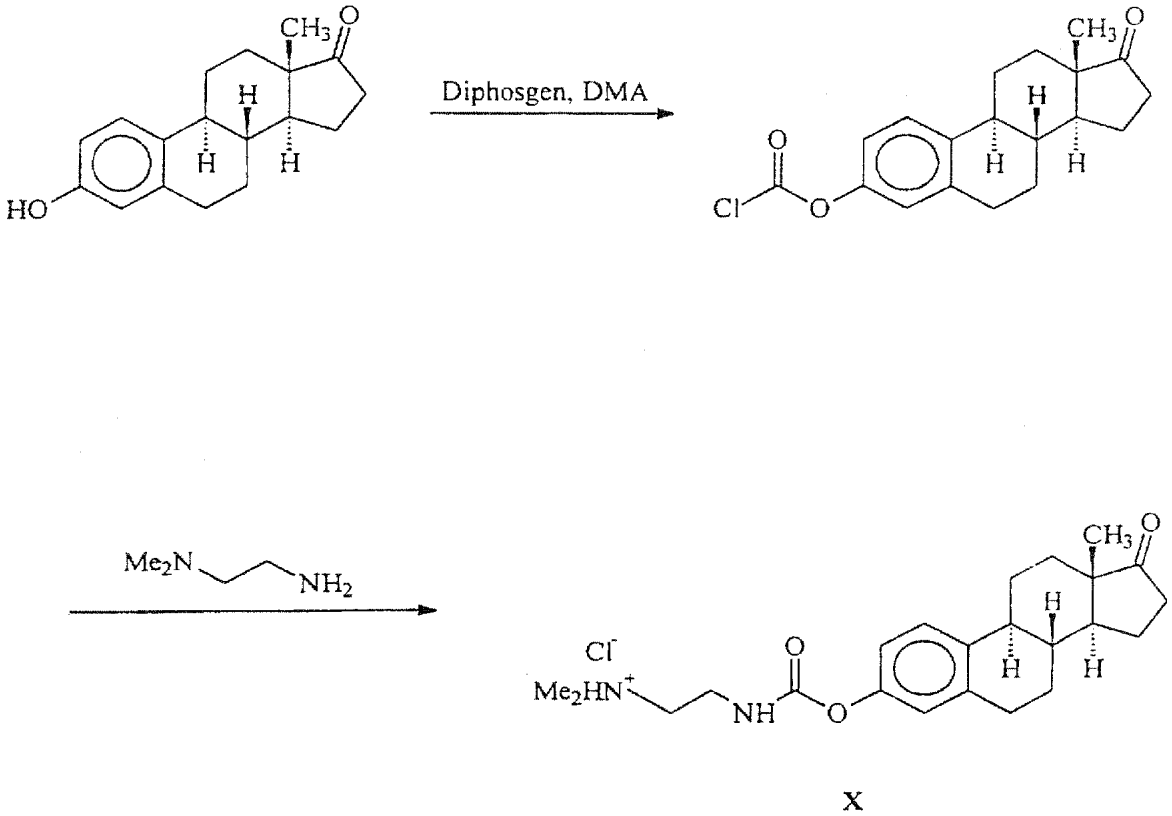


VIII

Schema VII



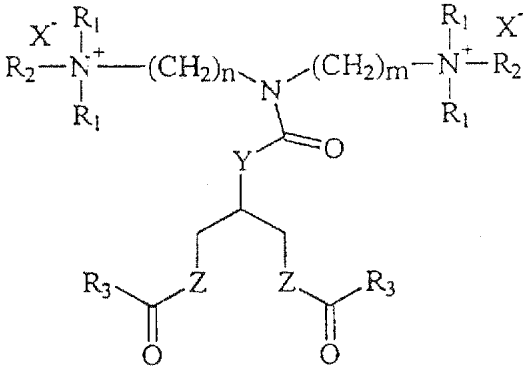
Schema VIII



X

Patentansprüche

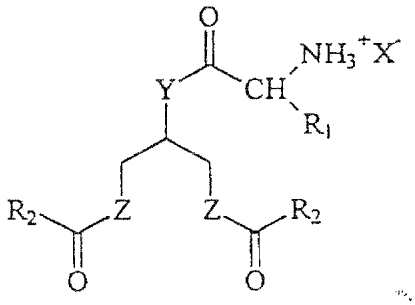
1. Kationische Lipide der allgemeinen Formel I,



I

wobei n=2,3,4,6,8 und m=2,3,6,8 sein kann und R_1 = H, CH_3, CH_2CH_2OH; R_2 = H, CH_3, CH_2CH_2OH, $(CH_2)_3N^+(R_1)_3$, R_3 einen geradkettigen, gesättigten oder ungesättigten aliphatischen Rest C_7-C_{21}, Z = CH_2, O, NH, Y = CH_2, O, NH und X = Cl, Br, I. CH_3COO, CF_3COO bedeutet.

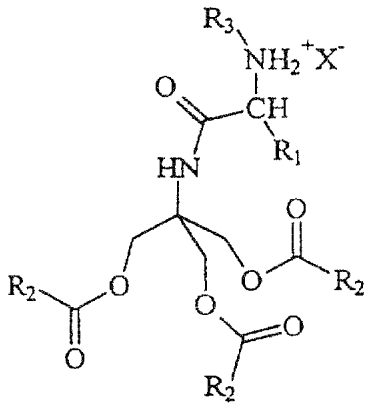
2. Kationische Lipide der Formel II,



II

wobei R_1 einen aliphatischen, aromatischen oder heteroaliphatischen α-C-Atom-Substituenten der α-Aminosäuren Glycin, Alanin, Valin, Leucin, Isoleucin, Phenylalanin, Tyrosin, Prolin, Hydroxyprolin, Serin, Threonin, Cystein, Cystin, Methionin, Tryptophan, Arginin, Lysin, Ornithin, Histidin, R_2 einen geradkettigen, gesättigten oder ungesättigten aliphatischen Rest C_7-C_{21}, X = Cl, Br, I, CH_3COO, CF_3COO, Y = CH_2, O, NH und Z = CH_2, O, NH bedeutet.

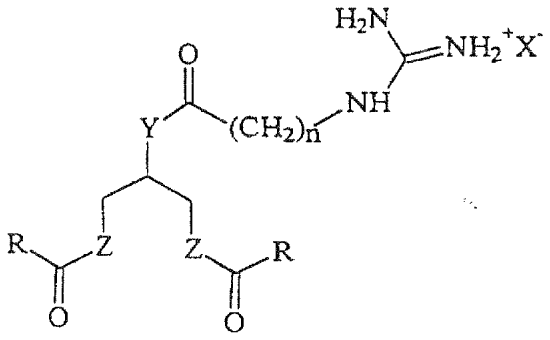
3. Kationische Lipide der allgemeinen Formel III,



III

wobei R_1 = H, CH_3, $(CH_2)_3NH_2^+X^-(CH_2)_3NH_3^+X^-$, R_3 = H, $(CH_2)_3NH_3^+X^-$, R_2 einen geradkettigen, gesättigten oder ungesättigten aliphatischen Rest C_7-C_{21} und X = Cl, Br, I, CH_3COO, CF_3COO bedeutet.

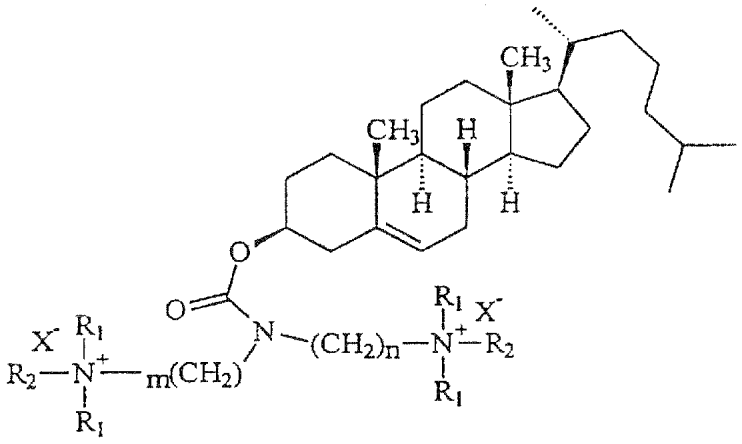
4. Kationische Lipide der allgemeinen Formel IV,



IV

wobei n=1-4 sein kann und R einen geradkettigen, gesättigten oder ungesättigten aliphatischen Rest C_7-C_{21}, Y = CH_2, O, NH, Z = CH_2, O, NH und X = Cl, Br, I, CH_3COO, CF_3COO bedeutet.

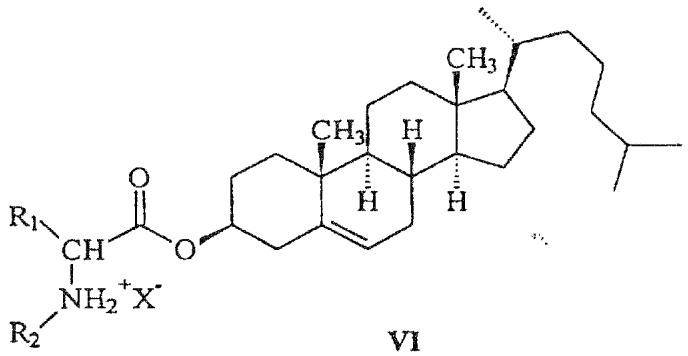
5. Kationische Lipide der allgemeinen Formel V,



V

wobei n=2,3,4,6,8 und m=2,3,6,8 sein kann und R_1 = H. CH_3, CH_2CH_2OH; R_2 = H, CH_3, CH_2CH_2OH, $(CH_2)_3N^+(R_1)_3$ und X = Cl, Br, I, CH_3COO, CF_3COO bedeutet.

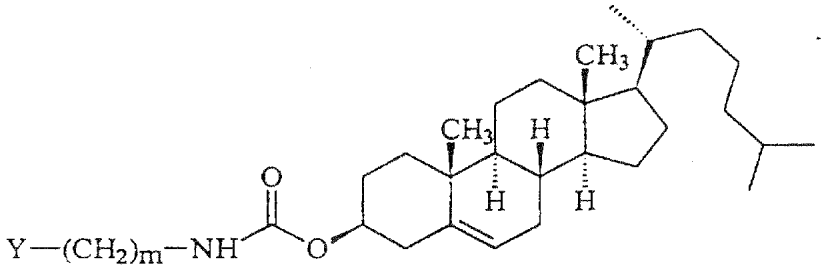
6. Kationische Lipide der allgemeinen Formel VI,



VI

wobei R_1 = H, CH_3, $(CH_2)_3NH_2^+X^-(CH_2)_3NH_3^+X^-$, $(CH_2)_3NH_3^+X^-$, R_2 = H, $(CH_2)_3NH_3^+X^-$ und X = Cl, Br, I, CH_3COO, CF_3COO bedeutet.

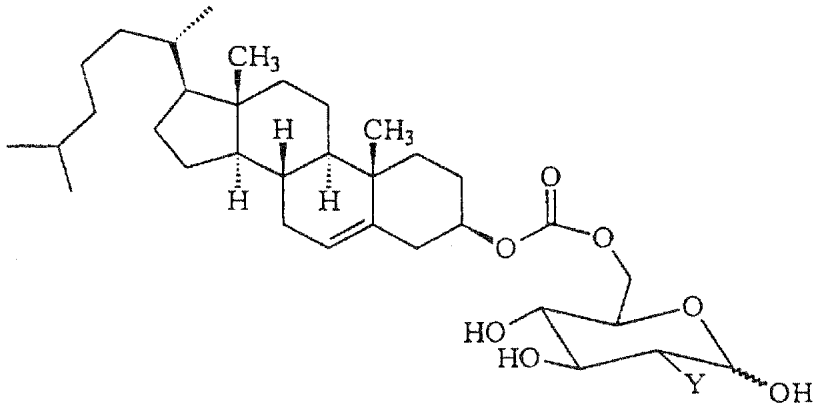
7. Kationische Lipide der allgemeinen Formel VII,



VII

wobei m=2-6 sein kann und Y eine Gruppe $N(R)_3^+X^-$ mit R = H, CH_3, $(CH_2)_2OH$ oder eine Gruppe $NH\text{-}C(NH_2^+X^-)NH_2$ mit X = Cl, Br, I, CH_3COO, CF_3COO bedeutet.

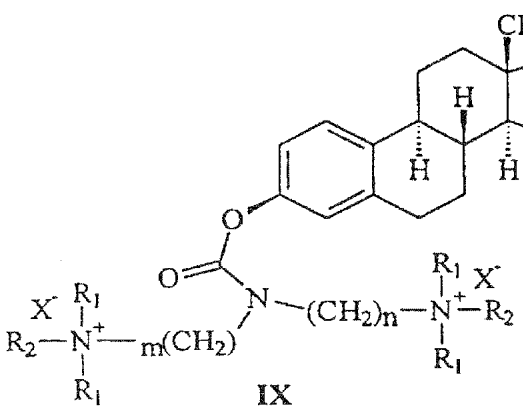
8. Kationische Lipide der allgemeinen Formel VIII,



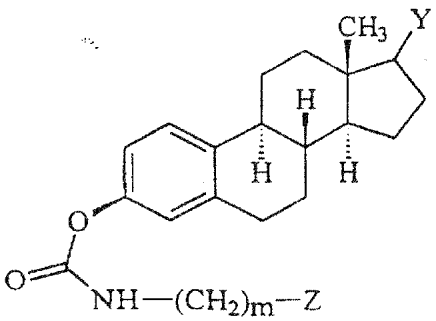
VIII

wobei Y eine Gruppe $N(R)_3^+X^-$ mit R = H, CH_3, $(CH_2)_2OH$ oder eine Gruppe $NH\text{-}C(NH_2^+X^-)NH_2$ mit X = Cl, Br, I, CH_3COO, CF_3COO bedeutet.

9. Kationische Lipide der allgemeinen Formel IX und X,



IX



X

wobei n=2,3,4,6,8 und m=2,3,6,8 sein kann und R_1 = H, CH_3, CH_2CH_2OH; R_2 = H, CH_3, CH_2CH_2OH, $(CH_2)_3N^+(R_1)_3$, R = H, CH_3, $(CH_2)_2OH$, Y eine Gruppe Carbonyl (=O (Östron)) oder eine Gruppe OH (Östradiol), Z eine Gruppe $N(R)_3^+X^-$ mit R = H, CH_3, $(CH_2)_2OH$ oder eine Gruppe $NH\text{-}C(NH_2^+X^-)NH_2$ und X = Cl, Br, I, CH_3COO, CF_3COO bedeutet.

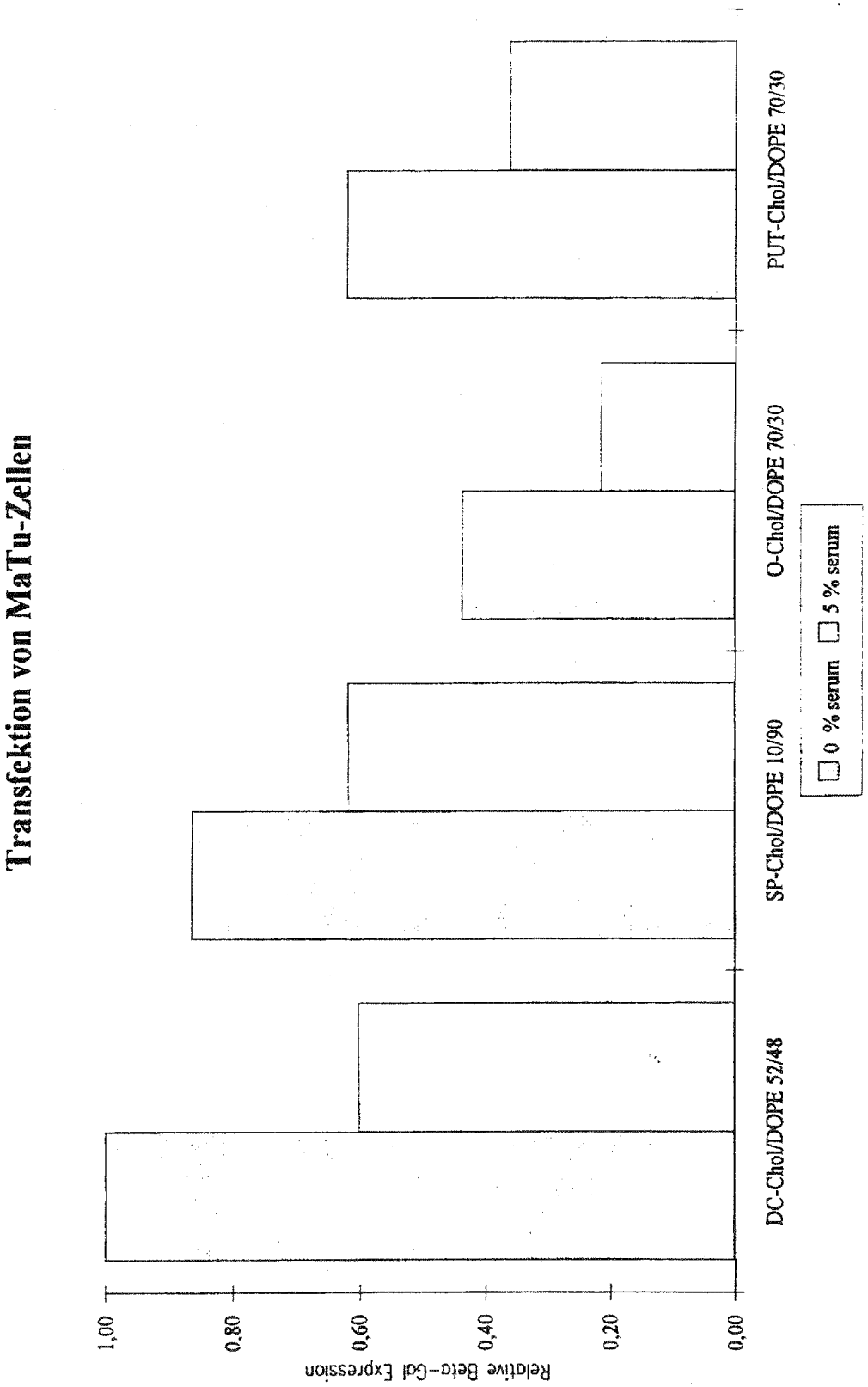

Transfektion von MaTu-Zellen
Relative Beta-Gal Expression
1,00
0,80
0,60
0,40
0,20
0,00
DC-Chol/DOPE 52/48
SP-Chol/DOPE 10/90
O-Chol/DOPE 70/30
PUT-Chol/DOPE 70/30
0 % serum
5 % serum

Abb.1

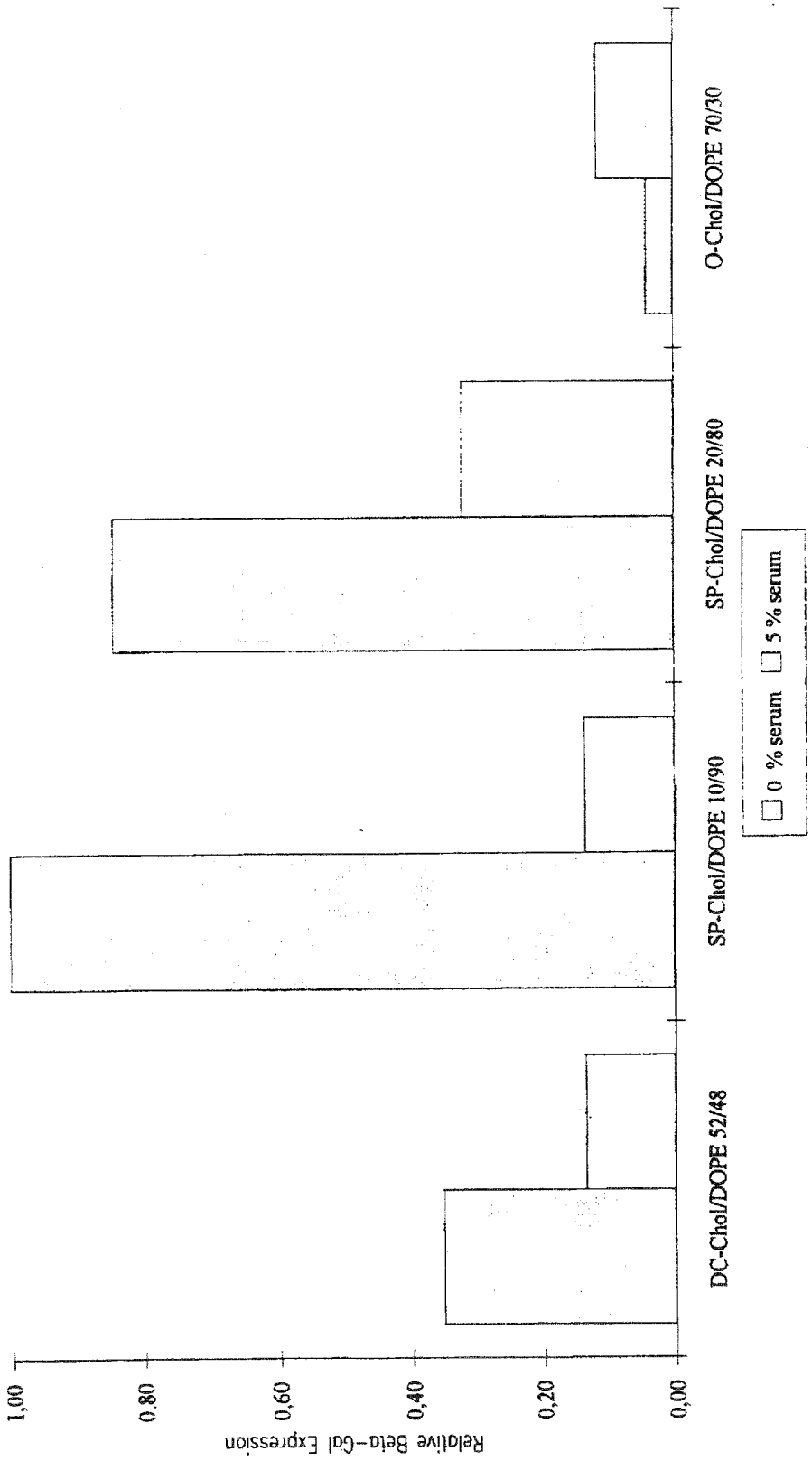

Transfektion von F98-Zellen
Relative Beta-Gal Expression
1,00
0,80
0,60
0,40
0,20
0,00
DC-Chol/DOPE 52/48
SP-Chol/DOPE 10/90
SP-Chol/DOPE 20/80
O-Chol/DOPE 70/30
0 % serum
5 % serum

Abb.2

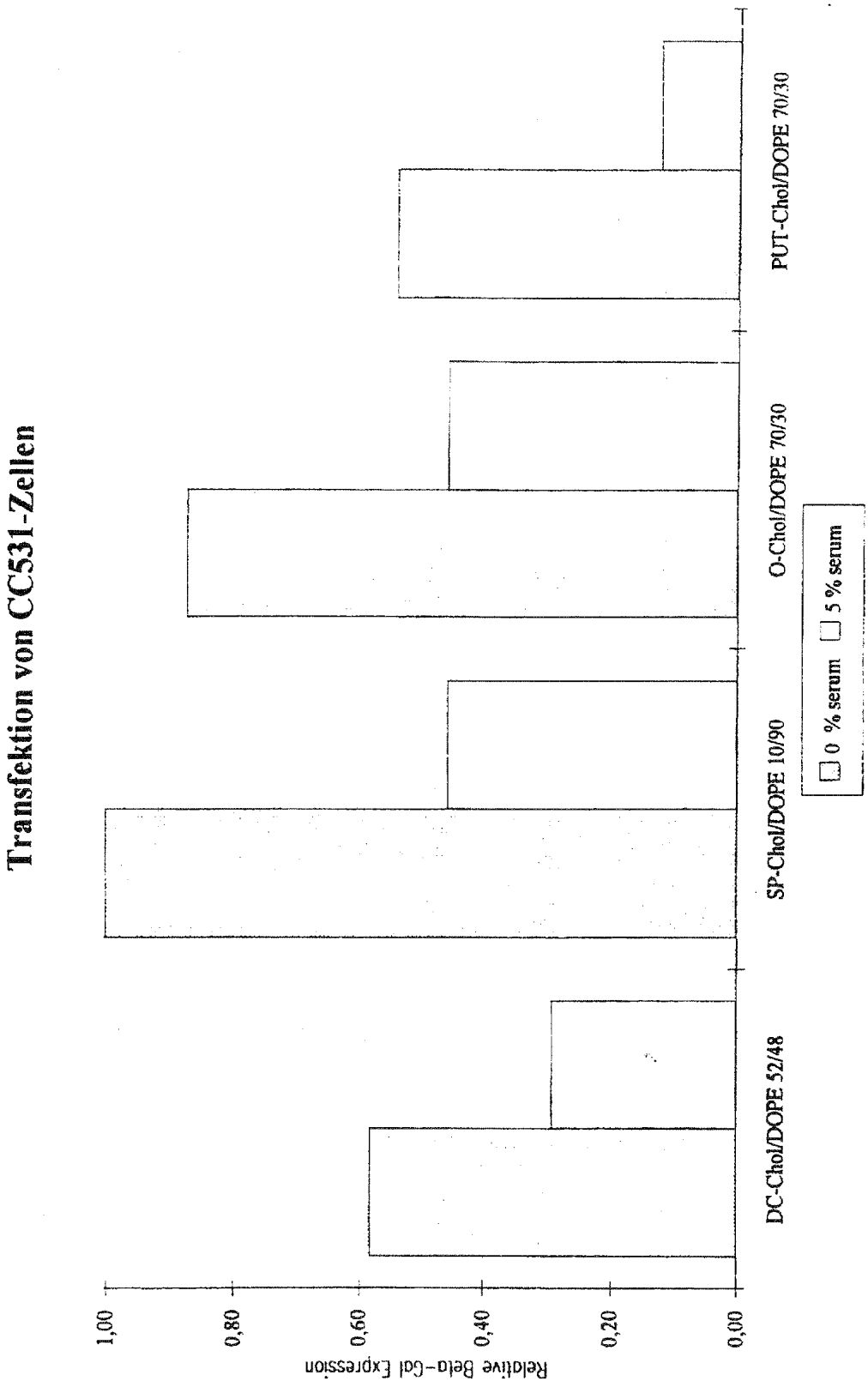

Transfektion von CC531-Zellen
Relative Beta-Gal Expression
1,00
0,80
0,60
0,40
0,20
0,00
DC-Chol/DOPE 52/48
SP-Chol/DOPE 10/90
O-Chol/DOPE 70/30
PUT-Chol/DOPE 70/30
0 % serum
5 % serum

Abb.3

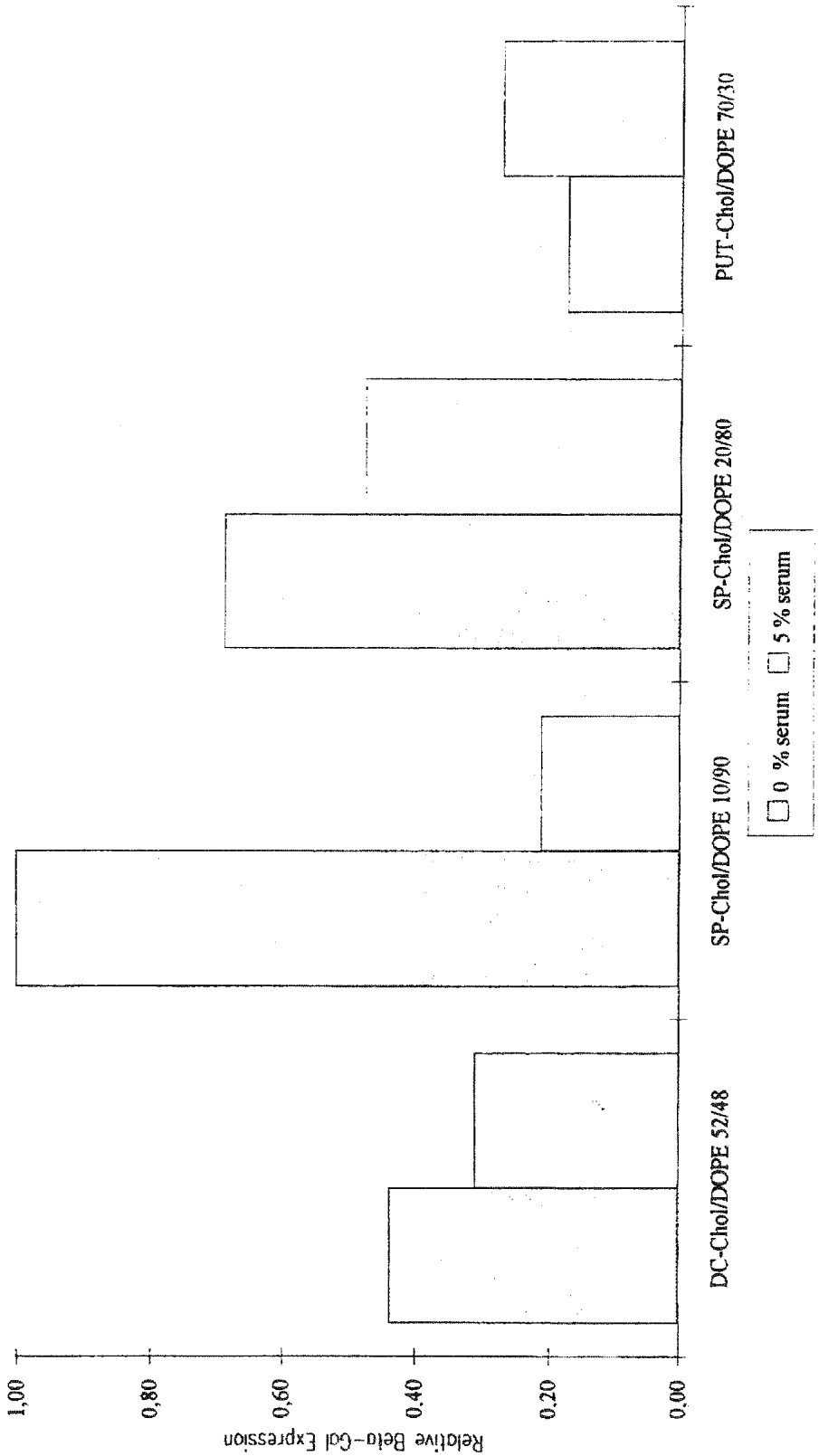

Transfektion von N64-Zellen
Relative Beta-Gal Expression
1,00
0,80
0,60
0,40
0,20
0,00
DC-Chol/DOPE 52/48
SP-Chol/DOPE 10/90
SP-Chol/DOPE 20/80
PUT-Chol/DOPE 70/30
0 % serum
5 % serum

Abb.4

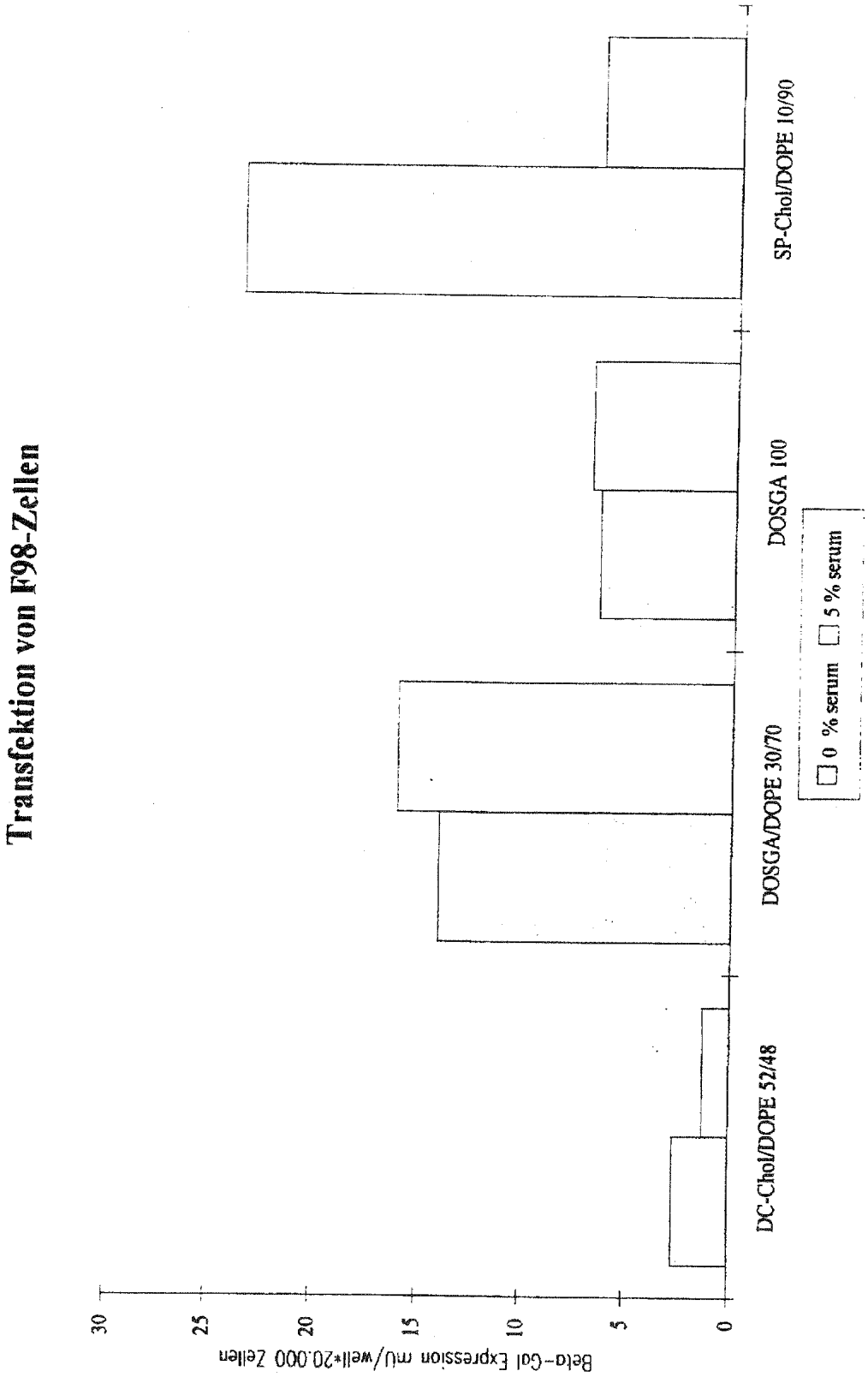

Transfektion von F98-Zellen
Beta-Gal Expression mU/well*20.000 Zellen
0
5
10
15
20
25
30
DC-Chol/DOPE 52/48
DOSGA/DOPE 30/70
DOSGA 100
SP-Chol/DOPE 10/90
0 % serum
5 % serum

Abb.5

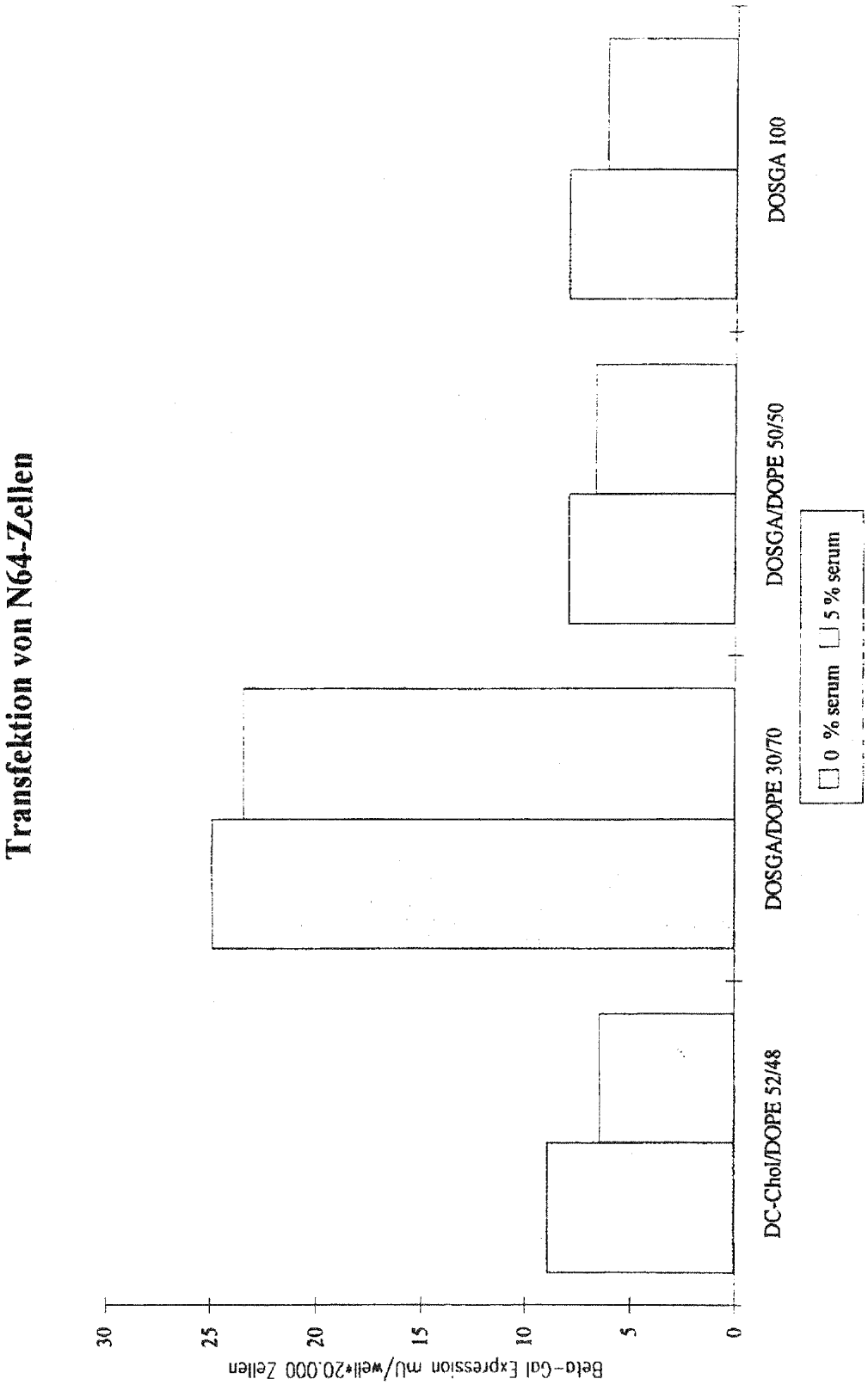

Transfektion von N64-Zellen
Beta-Gal Expression mU/well*20.000 Zellen
30
25
20
15
10
5
0
DC-Chol/DOPE 52/48
DOSGA/DOPE 30/70
DOSGA/DOPE 50/50
DOSGA 100
0 % serum
5 % serum

Abb.6

PCT WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro

INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation 6 : **C07J 41/00, C07C 271/20, 279/14, 237/08, A61K 31/575, 9/127, 31/16, 31/325, 31/155, C12N 15/63**	**A3**	**(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 98/05678** **(43) Internationales Veröffentlichungsdatum:** 12. Februar 1998 (12.02.98)

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE97/01669

(22) Internationales Anmeldedatum: 1. August 1997 (01.08.97)

(30) Prioritätsdaten:
196 31 189.6 2. August 1996 (02.08.96) DE

(71) Anmelder *(für alle Bestimmungsstaaten ausser US)*: MAX-DELBRÜCK-CENTRUM FÜR MOLEKULARE MEDIZIN [DE/DE]; Robert-Rössle-Strasse 10, D-13125 Berlin (DE).

(71)(72) Anmelder und Erfinder: SCHNEIDER, Manfred [DE/DE]; Triebelsheider Weg 47, D-42111 Wuppertal (DE).

(72) Erfinder; und
(75) Erfinder/Anmelder *(nur für US)*: KEIL, Oliver [DE/DE]; Krotscheiderweg 52, D-42327 Wuppertal (DE). RESZKA, Regina [DE/DE]; Goethestrasse 23, D-16341 Schwanebeck (DE). GROTH, Detlef [DE/DE]; Neue Scheune 5, D-14548 Ferch (DE).

(74) Anwalt: BAUMBACH, Fritz; BioTez Berlin-Buch GmbH, Patentstelle, Robert-Rössle-Strasse 10, D-13125 Berlin (DE).

(81) Bestimmungsstaaten: JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).

Veröffentlicht
Mit internationalem Recherchenbericht.
Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.

(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen Recherchenberichts: 25. Februar 1999 (25.02.99)

(54) Title: NOVEL CATIONIC AMPHIPHILIC LIPIDS FOR LIPOSOMAL GENE TRANSFER

(54) Bezeichnung: NEUARTIGE KATIONISCHE AMPHIPHILE FÜR DEN LIPOSOMALEN GENTRANSFER

(57) Abstract

The synthesis of novel cationic, amphiphilic lipids is disclosed, as well as their use as gene transfer vesicles *in vitro* and *in vivo*. A series of different lipids (diglycerides, steroids) was synthesised by modification with variable cationic molecules (amino acids, biogenic amines). Because of their ability to form complexes with polynucleotides (DNA, RNA, antisense oligonucleotides, ribozymes, etc.), compounds of this type are useful as vectors for gene transfer (transfection).

(57) Zusammenfassung

Die vorliegende Erfindung betrifft die Synthese neuartiger kationischer, amphiphiler Lipide und deren Anwendung als Gentransfervesikel *in vitro* und *in vivo*. Dazu wurden eine Reihe unterschiedlicher Lipide (Diglyceride, Steroide) durch Modifizierung mit variablen kationischen Molekülen (Aminosäuren, biogene Amine) synthetisiert. Verbindungen dieser Art eignen sich, aufgrund ihrer Fähigkeit mit Polynukleotiden (DNS, RNS, Antisense Oligonukleotide, Ribozyme usw.) zu komplexieren, als Vektoren für den Gentransfer (Transfektion).

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	**ES**	Spanien	**LS**	Lesotho	**SI**	Slowenien
AM	Armenien	**FI**	Finnland	**LT**	Litauen	**SK**	Slowakei
AT	Österreich	**FR**	Frankreich	**LU**	Luxemburg	**SN**	Senegal
AU	Australien	**GA**	Gabun	**LV**	Lettland	**SZ**	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	**GB**	Vereinigtes Königreich	**MC**	Monaco	**TD**	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	**GE**	Georgien	**MD**	Republik Moldau	**TG**	Togo
BB	Barbados	**GH**	Ghana	**MG**	Madagaskar	**TJ**	Tadschikistan
BE	Belgien	**GN**	Guinea	**MK**	Die ehemalige jugoslawische	**TM**	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	**GR**	Griechenland		Republik Mazedonien	**TR**	Türkei
BG	Bulgarien	**HU**	Ungarn	**ML**	Mali	**TT**	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	**IE**	Irland	**MN**	Mongolei	**UA**	Ukraine
BR	Brasilien	**IL**	Israel	**MR**	Mauretanien	**UG**	Uganda
BY	Belarus	**IS**	Island	**MW**	Malawi	**US**	Vereinigte Staaten von
CA	Kanada	**IT**	Italien	**MX**	Mexiko		Amerika
CF	Zentralafrikanische Republik	**JP**	Japan	**NE**	Niger	**UZ**	Usbekistan
CG	Kongo	**KE**	Kenia	**NL**	Niederlande	**VN**	Vietnam
CH	Schweiz	**KG**	Kirgisistan	**NO**	Norwegen	**YU**	Jugoslawien
CI	Côte d'Ivoire	**KP**	Demokratische Volksrepublik	**NZ**	Neuseeland	**ZW**	Zimbabwe
CM	Kamerun		Korea	**PL**	Polen		
CN	China	**KR**	Republik Korea	**PT**	Portugal		
CU	Kuba	**KZ**	Kasachstan	**RO**	Rumänien		
CZ	Tschechische Republik	**LC**	St. Lucia	**RU**	Russische Föderation		
DE	Deutschland	**LI**	Liechtenstein	**SD**	Sudan		
DK	Dänemark	**LK**	Sri Lanka	**SE**	Schweden		
EE	Estland	**LR**	Liberia	**SG**	Singapur		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/DE 97/01669

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 C07J41/00 C07C271/20 C07C279/14 C07C237/08 A61K31/575
A61K9/127 A61K31/16 A61K31/325 A61K31/155 C12N15/63

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C07J C07C A61K C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	WO 97 00241 A (BOEHRINGER MANNHEIM GMBH ;FERNHOLZ ERHARD (DE); ELTZ HERBERT VON D) 3 January 1997 see figures 3-6 ---	1,2
X	WO 86 04579 A (UNIV LOUVAIN) 14 August 1986 see claims ---	2
X	WO 95 04030 A (COMMW SCIENT IND RES ORG ;WHITTAKER ROBERT GEORGE (AU); BENDER VER) 9 February 1995 see page 8; examples ---	3
X	WO 96 22303 A (COMMW SCIENT IND RES ORG ;WHITTAKER ROBERT GEORGE (AU); BENDER VER) 25 July 1996 see claims; examples --- -/--	3

[X] Further documents are listed in the continuation of box C.

[X] Patent family members are listed in annex.

° Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
18 December 1998	04/01/1999

Name and mailing address of the ISA	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Sánchez García, J.M.

3

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/DE 97/01669

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication,where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 96 18372 A (GENZYME CORP) 20 June 1996 see claims; examples	5
X	WO 94 04545 A (UNIV LEIDEN ;NL HARTSTICHTING (NL); BIESSEN ERICUS ANNA LEONARDUS) 3 March 1994 see page 23, line 15 - line 35	6
X	FR 2 551 758 A (ANVAR) 15 March 1985 see page 11, line 5 - line 15	6
X	WO 96 14831 A (PASTEUR MERIEUX SERUMS VACC ;HAENSLER JEAN (FR); TRANNOY EMMANUELL) 23 May 1996 see figure 1	7
A	EP 0 038 750 A (MERCK & CO INC) 28 October 1981 see claims	8
X	US 4 584 136 A (YOSHIDA MASARU ET AL) 22 April 1986 see column 3	9

3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No
PCT/DE 97/01669

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9700241 A	03-01-1997	DE 19521412 A	19-12-1996
		AU 6355396 A	15-01-1997
		CA 2224566 A	03-01-1997
		CN 1193316 A	16-09-1998
		EP 0835238 A	15-04-1998
		NO 975853 A	16-02-1998
WO 8604579 A	14-08-1986	LU 85757 A	02-09-1986
		DK 437586 A	12-09-1986
		EP 0250403 A	07-01-1988
		FI 871270 A	23-03-1987
		JP 63501498 T	09-06-1988
WO 9504030 A	09-02-1995	AU 683289 B	06-11-1997
		AU 7342094 A	28-02-1995
		CA 2167818 A	09-02-1995
		CN 1128531 A	07-08-1996
		EP 0712389 A	22-05-1996
		FI 960504 A	02-02-1996
		JP 9501655 T	18-02-1997
		NO 960389 A	30-01-1996
		NZ 269773 A	24-11-1997
		US 5792786 A	11-08-1998
WO 9622303 A	25-07-1996	AU 4426996 A	07-08-1996
		CA 2210500 A	25-07-1996
		EP 0804459 A	05-11-1997
		FI 973002 A	19-08-1997
		NO 973283 A	08-09-1997
WO 9618372 A	20-06-1996	US 5650096 A	22-07-1997
		US 5747471 A	05-05-1998
		AU 4516196 A	03-07-1996
		CA 2205968 A	20-06-1996
		EP 0799059 A	08-10-1997
		JP 10510813 T	20-10-1998
		US 5767099 A	16-06-1998
		US 5840710 A	24-11-1998
		US 5719131 A	17-02-1998
		US 5783565 A	21-07-1998
WO 9404545 A	03-03-1994	NL 9201440 A	01-03-1994
		AT 168694 T	15-08-1998
		AU 674160 B	12-12-1996
		AU 4835593 A	15-03-1994
		DE 69319912 D	27-08-1998
		EP 0655070 A	31-05-1995
		JP 8502726 T	26-03-1996
FR 2551758 A	15-03-1985	AU 588219 B	14-09-1989
		AU 3200384 A	21-02-1985
		CA 1257584 A	18-07-1989
		DK 393184 A	17-02-1985
		EP 0139554 A	02-05-1985
		JP 60126297 A	05-07-1985
		US 4663311 A	05-05-1987
WO 9614831 A	23-05-1996	FR 2726764 A	15-05-1996

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

In ıtional Application No
PCT/DE 97/01669

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9614831 A		AU 4180296 A	06-06-1996
		CA 2205022 A	23-05-1996
		CN 1168629 A	24-12-1997
		EP 0793484 A	10-09-1997
EP 0038750 A	28-10-1981	US 4368190 A	11-01-1983
		AT 23537 T	15-11-1986
		CA 1174232 A	11-09-1984
		DK 172481 A	18-10-1981
		GR 76828 A	04-09-1984
		JP 56164196 A	17-12-1981
		PT 72866 B	25-11-1985
US 4584136 A	22-04-1986	JP 61007292 A	13-01-1986

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

nationales Aktenzeichen
PCT/DE 97/01669

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 6 C07J41/00 C07C271/20 C07C279/14 C07C237/08 A61K31/575
A61K9/127 A61K31/16 A61K31/325 A61K31/155 C12N15/63

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
IPK 6 C07J C07C A61K C12N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
P,X	WO 97 00241 A (BOEHRINGER MANNHEIM GMBH ;FERNHOLZ ERHARD (DE); ELTZ HERBERT VON D) 3. Januar 1997 siehe Abbildungen 3-6 ---	1,2
X	WO 86 04579 A (UNIV LOUVAIN) 14. August 1986 siehe Ansprüche ---	2
X	WO 95 04030 A (COMMW SCIENT IND RES ORG ;WHITTAKER ROBERT GEORGE (AU); BENDER VER) 9. Februar 1995 siehe Seite 8; Beispiele ---	3
X	WO 96 22303 A (COMMW SCIENT IND RES ORG ;WHITTAKER ROBERT GEORGE (AU); BENDER VER) 25. Juli 1996 siehe Ansprüche; Beispiele ---	3

-/--

[X] Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

[X] Siehe Anhang Patentfamilie

° Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche	Absendedatum des internationalen Recherchenberichts
18. Dezember 1998	04/01/1999

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde	Bevollmächtigter Bediensteter
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Sánchez García, J.M.

3

Formblatt PCT/ISA/210 (Blatt 2) (Juli 1992)

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/DE 97/01669

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 96 18372 A (GENZYME CORP) 20. Juni 1996 siehe Ansprüche; Beispiele	5
X	WO 94 04545 A (UNIV LEIDEN ;NL HARTSTICHTING (NL); BIESSEN ERICUS ANNA LEONARDUS) 3. März 1994 siehe Seite 23, Zeile 15 - Zeile 35	6
X	FR 2 551 758 A (ANVAR) 15. März 1985 siehe Seite 11, Zeile 5 - Zeile 15	6
X	WO 96 14831 A (PASTEUR MERIEUX SERUMS VACC ;HAENSLER JEAN (FR); TRANNOY EMMANUELL) 23. Mai 1996 siehe Abbildung 1	7
A	EP 0 038 750 A (MERCK & CO INC) 28. Oktober 1981 siehe Ansprüche	8
X	US 4 584 136 A (YOSHIDA MASARU ET AL) 22. April 1986 siehe Spalte 3	9

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen
PCT/DE 97/01669

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
WO 9700241	A	03-01-1997	DE	19521412 A	19-12-1996
			AU	6355396 A	15-01-1997
			CA	2224566 A	03-01-1997
			CN	1193316 A	16-09-1998
			EP	0835238 A	15-04-1998
			NO	975853 A	16-02-1998
WO 8604579	A	14-08-1986	LU	85757 A	02-09-1986
			DK	437586 A	12-09-1986
			EP	0250403 A	07-01-1988
			FI	871270 A	23-03-1987
			JP	63501498 T	09-06-1988
WO 9504030	A	09-02-1995	AU	683289 B	06-11-1997
			AU	7342094 A	28-02-1995
			CA	2167818 A	09-02-1995
			CN	1128531 A	07-08-1996
			EP	0712389 A	22-05-1996
			FI	960504 A	02-02-1996
			JP	9501655 T	18-02-1997
			NO	960389 A	30-01-1996
			NZ	269773 A	24-11-1997
			US	5792786 A	11-08-1998
WO 9622303	A	25-07-1996	AU	4426996 A	07-08-1996
			CA	2210500 A	25-07-1996
			EP	0804459 A	05-11-1997
			FI	973002 A	19-08-1997
			NO	973283 A	08-09-1997
WO 9618372	A	20-06-1996	US	5650096 A	22-07-1997
			US	5747471 A	05-05-1998
			AU	4516196 A	03-07-1996
			CA	2205968 A	20-06-1996
			EP	0799059 A	08-10-1997
			JP	10510813 T	20-10-1998
			US	5767099 A	16-06-1998
			US	5840710 A	24-11-1998
			US	5719131 A	17-02-1998
			US	5783565 A	21-07-1998
WO 9404545	A	03-03-1994	NL	9201440 A	01-03-1994
			AT	168694 T	15-08-1998
			AU	674160 B	12-12-1996
			AU	4835593 A	15-03-1994
			DE	69319912 D	27-08-1998
			EP	0655070 A	31-05-1995
			JP	8502726 T	26-03-1996
FR 2551758	A	15-03-1985	AU	588219 B	14-09-1989
			AU	3200384 A	21-02-1985
			CA	1257584 A	18-07-1989
			DK	393184 A	17-02-1985
			EP	0139554 A	02-05-1985
			JP	60126297 A	05-07-1985
			US	4663311 A	05-05-1987
WO 9614831	A	23-05-1996	FR	2726764 A	15-05-1996

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

I ationales Aktenzeichen
PCT/DE 97/01669

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9614831 A		AU 4180296 A	06-06-1996
		CA 2205022 A	23-05-1996
		CN 1168629 A	24-12-1997
		EP 0793484 A	10-09-1997
EP 0038750 A	28-10-1981	US 4368190 A	11-01-1983
		AT 23537 T	15-11-1986
		CA 1174232 A	11-09-1984
		DK 172481 A	18-10-1981
		GR 76828 A	04-09-1984
		JP 56164196 A	17-12-1981
		PT 72866 B	25-11-1985
US 4584136 A	22-04-1986	JP 61007292 A	13-01-1986